



Universidad de Concepción
Facultad Farmacia

**EFFECTOS DE ALOE-EMODINA EN LA ATHEROSCLEROSIS
TEMPRANA INDUCIDA EN MODELO DE LARVA DE PEZ CEBRA
CON DIETA ALTA EN COLESTEROL**

POR MD. GABRIELA LIBERTAD FLORES MORENO

***Tesis presentada a la facultad de farmacia de la universidad de
concepción para optar al grado profesional de Magister en
Bioquímica Clínica e Inmunología***

Tutor: Dr. Claudio Aguayo Tapia
Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Co-Tutor: Dra. Javiera De la Paz Montt
Departamento de Biología Celular
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Concepción, Chile 2026

INDICE

DEDICATORIA.....	VIII
AGRADECIMIENTOS.....	IX
RESUMEN.....	X
ABSTRACT.....	XII
INTRODUCCIÓN.....	1
1. Aterosclerosis.....	2
2. Fisiopatología de la aterosclerosis.....	3
3. Aterosclerosis Temprana:.....	7
4. Modelos experimentales para el estudio de la aterogénesis.....	10
1.1. Modelo <i>Danio rerio</i>	13
5. Prevención de la aterosclerosis.....	20
6. Pez cebra y Aloe emodina.....	25
PROBLEMA.....	27
PREGUNTA.....	27
HIPÓTESIS.....	27
OBJETIVOS:.....	28
Objetivo general.....	28
Objetivos específicos.....	28
MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
1. Aprobación ética.....	29
2. Modelos animales:.....	29
3. Bioseguridad.....	29
4. Mantenimiento de larvas de peces cebra.....	30
5. Preparación de la dieta.....	31

6. Grupos experimentales:	32
7. Administración de Aloe Emodina	34
8. Mortalidad y Determinación de parámetros de crecimiento:	35
9. Medición de parámetros bioquímicos	35
10. Conteo de granulocitos	36
11. Lípidos en hígado de larva de pez cebra.	38
12. Análisis estadístico.....	39
RESULTADOS	40
DISCUSIÓN	76
CONCLUSIONES.....	84
BIBLIOGRAFÍA.....	86
ANEXO 1	90
ANEXO 2	91
ANEXO 3	93
ANEXO 4	94
ANEXO 5	95
ANEXO 6	96
ANEXO 7	97

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Fisiopatología de la aterogénesis asociada al receptor de lipoproteína de baja densidad LOX-1.....	7
Figura 2: Ciclo de vida del pez cebra (Danio rerio) desde el estadio embrionario hasta el pez adulto.	20
Figura 3: Estructura química de la Aloe-emodina.	23
Figura 4 Curva de letalidad en larvas de pez cebra expuestas Aloe-emodina.	43
Figura 5: Activación del reportero de hsp70 en hígado de larvas de pez cebra expuestas al Aloe emodina.	46
Figura 6 Evaluación de acumulación lipídica hepática en larvas de pez cebra expuestas a aloe emodina.....	48
Figura 7:Curvas de supervivencia de larvas de pez cebra alimentadas con diferentes dietas durante 10 días.....	50
Figura 8: Medición de longitud total en larvas de pez cebra alimentadas con dieta suplementada con colesterol.	52
Figura 9 :Parámetros bioquímicos en larvas de Danio rerio alimentadas con diferentes condiciones dietarias.....	55
Figura 10 Cuantificación de granulocitos en la región de la vena cardinal en larvas de pez cebra alimentadas con dieta suplementada con colesterol.	57

Figura 11: Imágenes representativas de la tinción con Sudan Black en el sistema vascular de larvas de pez cebra alimentadas con diferentes condiciones dietarias.	59
Figura 12: Análisis morfométrico del sistema vascular en larvas de pez cebra alimentadas con diferentes condiciones dietarias.	60
Figura 13. Curvas de supervivencia de larvas de pez cebra alimentadas con dieta suplementada con colesterol y tratadas con aloe emodina.	62
Figura 14: Medición de longitud total en larvas de pez cebra alimentadas con dieta suplementada con colesterol y tratadas con aloe emodina	64
Figura 15 :Parámetros bioquímicos en larvas de Danio rerio alimentadas con dieta suplementada con 4% de colesterol y tratadas con aloe emodina.	67
Figura 16: Cuantificación de granulocitos en la región de la vena cardinal en larvas de pez cebra alimentadas con dieta suplementada con colesterol y tratadas con Aloe emodina.	69
Figura 17 Imágenes representativas de la tinción con Sudan Black en el sistema vascular de larvas de pez cebra alimentadas con dieta suplementada con colesterol.	71
Figura 18: Análisis morfométrico del sistema vascular en larvas de pez cebra alimentadas con dieta suplementada con colesterol y tratadas con aloe emodina.	72

Figura 19: Depósitos lipídicos hepáticos en larvas de pez cebra alimentadas con diferentes dietas y tratadas con Aloe emodina.....	75
---	-----------

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Efectos subletales en larvas de pez cebra a las 24 horas de exposición continua de Aloe emodina.	41
Tabla 2 :Efectos subletales en larvas de pez cebra a las 48 horas de exposición continua de Aloe emodina.	42
Tabla 3 :Parámetros bioquímicos en larvas de pez cebra alimentadas con diferentes condiciones dietarias.....	54
Tabla 4:Parámetros bioquímicos en larvas de pez cebra alimentadas con dieta suplementada con 4% de colesterol y expuestas al tratamiento de Aloe emodina.	66

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi hijo, **Alessandro Román Parrales Flores**, quien comenzó a formarse dentro de mí durante el último año de este postgrado. Tu llegada se convirtió en la mayor motivación para continuar este camino y culminar esta etapa. Eres, y siempre serás, la razón que me impulsa a seguir adelante.

Y, de manera muy especial, **en memoria de José Ernesto Zelaya Ortega**, quien fue para mí un padre. Gracias por tu amor, tu ejemplo y por acompañarme siempre de cerca en mi formación académica y personal. Este logro también honra tu recuerdo.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradezco a **Dios** por brindarme la vida, la fortaleza, la sabiduría y la perseverancia necesarias para culminar esta etapa de mi formación académica. Su guía y bendiciones han sido fundamentales para superar cada desafío presentado a lo largo de este camino.

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones que hicieron posible el desarrollo de esta tesis.

En primer lugar, agradezco a los **docentes de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción**, especialmente al **Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología**, por su formación académica, orientación y por contribuir al desarrollo de las competencias científicas necesarias para llevar a cabo este trabajo.

Agradezco profundamente a mis compañeros del **Laboratorio de Embriotoxicología e Interacción Desarrollo-Ambiente (LEIDA)** por su apoyo técnico, colaboración y por el ambiente de trabajo que favoreció el desarrollo de esta investigación.

Asimismo, agradezco a mis compañeras del **Magíster, cohorte 2024–2026**, por el compañerismo, la motivación y el apoyo mutuo a lo largo de este proceso formativo.

A mi esposo, **Félix Román Parrales López**, por caminar a mi lado en esta aventura, por su paciencia, comprensión y apoyo permanente durante este proceso. Tu compañía ha sido fundamental para poder llegar hasta aquí.

A mi madre, **Alba Libertad Moreno Reyes** y hermanas, por su amor y apoyo incondicional. Gracias por creer en mí y por acompañarme siempre en cada desafío y logro alcanzado.

Finalmente, expreso mi profundo agradecimiento al **Ejército de Nicaragua**, en particular a la **Facultad de Ciencias Médicas “Coronel y Dr. Juan Ignacio Gutiérrez Sacasa”**, por la beca académica brindada. Sin su apoyo institucional, no habría sido posible iniciar este camino de formación académica y desarrollo profesional.

RESUMEN

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por la acumulación progresiva de lípidos y células inmunitarias en la pared arterial, lo que conduce a la formación de placas ateromatosas capaces de comprometer el flujo sanguíneo y generar eventos cardiovasculares mayores. Debido a su desarrollo lento y generalmente asintomático en etapas tempranas, comprender los mecanismos iniciales de la aterogénesis continúa siendo un desafío. En este contexto, el pez cebra (*Danio rerio*) ha emergido como un modelo vertebrado relevante para el estudio de enfermedades cardiovasculares, ya que comparte características del metabolismo lipídico con los humanos y permite la observación directa de procesos celulares y vasculares in vivo durante el desarrollo temprano.

La aloe-emodina (AE) es una antraquinona presente en diversas especies vegetales, como *Aloe vera*, *Rheum palmatum* y *Cassia occidentalis*, que ha demostrado propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y moduladoras del metabolismo lipídico. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la aloe-emodina sobre la acumulación de células inflamatorias y depósitos lipídicos en un modelo de aterosclerosis temprana inducido por dieta alta en colesterol en larvas de pez cebra.

Inicialmente se determinaron concentraciones sub-tóxicas de AE mediante ensayos de toxicidad aguda, estableciendo concentraciones inferiores a 3 μM como seguras para su uso experimental. Posteriormente, las larvas fueron alimentadas durante 10 días con una dieta suplementada con 4% de colesterol y tratadas con AE mediante inmersión diaria. Se evaluaron parámetros de supervivencia, crecimiento larvario, marcadores bioquímicos asociados al metabolismo lipídico e inflamación, cuantificación de granulocitos mediante tinción con Sudan Black B y acumulación de depósitos lipídicos hepáticos y vasculares mediante tinciones histológicas.

Los resultados mostraron que la dieta suplementada con colesterol indujo alteraciones compatibles con un estado proaterogénico temprano, incluyendo incremento de granulocitos en la región vascular, aumento de depósitos lipídicos hepáticos y vasculares, modificaciones morfométricas del sistema vascular y tendencias al aumento de marcadores bioquímicos asociados a inflamación y metabolismo lipídico. En contraste, el tratamiento con aloe-emodina redujo significativamente la infiltración de granulocitos y la acumulación de lípidos, además de atenuar las alteraciones bioquímicas inducidas por la dieta hipercolesterolémica.

En conjunto, estos resultados sugieren que la aloe-emodina ejerce un efecto modulador sobre procesos inflamatorios y metabólicos asociados a la aterogénesis temprana, evidenciando su potencial como compuesto bioactivo en estrategias preventivas dirigidas a enfermedades cardiovasculares.

ABSTRACT

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease characterized by the progressive accumulation of lipids and immune cells within the arterial wall, leading to the formation of atherosclerotic plaques that can impair blood flow and trigger major cardiovascular events. Because this disease develops slowly and often remains asymptomatic during its early stages, understanding the mechanisms involved in early atherogenesis remains a major challenge. In this context, the zebrafish (*Danio rerio*) has emerged as a valuable vertebrate model for cardiovascular research due to similarities in lipid metabolism with humans and the possibility of directly visualizing cellular and vascular processes in vivo during early development.

Aloe-emodin (AE) is an anthraquinone compound present in several plant species, including *Aloe vera*, *Rheum palmatum*, and *Cassia occidentalis*. This compound has demonstrated multiple pharmacological properties, such as anti-inflammatory, antioxidant, and lipid-regulating effects. The aim of this study was to evaluate the effect of aloe-emodin on inflammatory cell accumulation and lipid deposition in a zebrafish larval model of early atherosclerosis induced by a high-cholesterol diet.

Initially, sub-toxic concentrations of AE were determined through acute toxicity assays, establishing concentrations below 3 μ M as safe for experimental use. Zebrafish larvae were then fed for 10 days with a diet supplemented with 4% cholesterol and treated daily with AE by immersion. Several parameters were evaluated, including larval survival, growth, biochemical markers associated with lipid metabolism and inflammation, granulocyte quantification using Sudan Black B staining, and hepatic and vascular lipid deposition using histological staining techniques.

The results showed that the cholesterol-enriched diet induced alterations consistent with an early pro-atherogenic state, including increased granulocyte accumulation in the vascular region, enhanced hepatic and vascular lipid deposition, vascular morphometric changes, and trends toward elevated biochemical markers related to inflammation and lipid metabolism. In contrast, treatment with aloe-emodin significantly reduced granulocyte infiltration and lipid deposition, while attenuating several biochemical alterations induced by the hypercholesterolemic diet.

Overall, these findings suggest that aloe-emodin modulates inflammatory and metabolic processes involved in early atherogenesis, highlighting its potential as a bioactive compound for preventive strategies against cardiovascular diseases.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son un conjunto de trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos que en la actualidad representan la principal causa de muerte en el mundo con alrededor de 17,9 millones defunciones anuales. Estadísticamente 4 de cada 5 defunciones por enfermedad cardiovascular se deben a cardiopatías de origen coronario, siendo la cardiopatía isquémica responsable del 16% del total de muertes. (OMS, 2021)

Según la OMS para el año 2021 en Chile morían más personas por enfermedades cardiovasculares que por cualquier otra causa. Entendiéndose como riesgo cardiovascular a la probabilidad de que un individuo tenga una enfermedad cardiovascular o un evento cardiovascular agudo; la carga de enfermedad cardiovascular representó en el año 2015 el 12,97% del total de los años de vida ajustados por discapacidad (AVISA), ocupando el segundo lugar después de las neoplasias y causando un 27.5% del total de defunciones (CIE-10 I00-I99) (28.318 defunciones, tasa 157.27/100.000), a expensas principalmente del ataque cerebrovascular (ACV) con un 30 % y del IAM con un 29%. Además se rediseño para la población chilena la estratificación según la escala de Framingham dividiendo el riesgo cardiovascular en Alto, Moderado y Bajo, en las encuestas nacionales del 2009-2010 y del 2016-2017, observándose que el 23,2% de la población tiene riesgo cardiovascular alto, el 25,5% riesgo cardiovascular moderado y el 51,3% riesgo bajo. (MINSAL, 2015)

1. Aterosclerosis

La aterosclerosis, es una enfermedad crónica, generaliza y progresiva que afecta arterias de mediano tamaño y se manifiesta clínicamente como cardiopatía isquémica (CI), enfermedad cerebrovascular y enfermedad arterial periférica. Se caracteriza por el engrosamiento y la pérdida de elasticidad de las paredes arteriales como consecuencia a la acumulación de lípidos, células inflamatorias y otros componentes en la pared arterial que forman la placa aterosclerótica, que pueden obstruir parcial o completamente el flujo sanguíneo en etapas más tardías de la enfermedad. (Libby, Ridker, & Hansson, 2011)

Es una patología multifactorial cuyos factores de riesgo además son predictores de mortalidad y/o aparición de la enfermedad entres estos se encuentran:

Factores de riesgo modificables:

- Consumo de tabaco.
- Niveles elevados de colesterol en sangre.
- Hipertensión arterial.
- Diabetes.
- Obesidad.
- Inactividad física.
- Consumo diario bajo de frutas y verduras frescas.

Factores de riesgo no modificables:

- Los antecedentes familiares de aterosclerosis prematura (es decir, tener un pariente cercano masculino que padeció la enfermedad antes de los 55 años o tener un pariente cercano femenino que padeció la enfermedad antes de los 65 años).
- Edad avanzada.
- Sexo masculino.

Existen muchos factores de riesgo que todavía se están estudiando, como los niveles elevados de proteína C reactiva (proteína inflamatoria) en la sangre, los niveles elevados de algunos componentes del colesterol (como la apolipoproteína B o la lipoproteína [a]) y factores psicosociales tales como: la ansiedad y un nivel socioeconómico bajo. (Thanassoulis & Aziz., 2022)

2. Fisiopatología de la aterosclerosis

El mecanismo de crecimiento de la placa en la aterosclerosis se fundamenta en la teoría de incrustación o teoría lipídica desarrollada por Virchow, la misma señala que el endotelio vascular (que es la zona más interna de la íntima arterial) precisamente por estar en contacto con el flujo sanguíneo es la interfaz biológica determinante para la homeostasis vascular, en este sentido la teoría plantea que si se presenta una lesión

mecánica (aumento de presión) o inflamatoria (tabaquismo, etc.) en esta área se favorece la insudación de lípidos plasmáticos. (Loaiza, 2001)

En la década de 1950 a 1960 Tracy y Cols comprobaron que las lesiones ateroscleróticas están formadas principalmente de lipoproteínas de baja densidad (LDL); las partículas LDL más pequeñas y las VLDL ingresan al espacio subendotelial en proporción a su nivel sérico, la apoproteína B de LDL y VLDL interactúa con los proteoglicanos presentes en la membrana del endotelio y al perder esta apoproteína con acción antioxidante la LDL sufre oxidación en el espacio subendotelial que inicia una respuesta inflamatoria.

Durante años, diversas teorías han intentado explicar el origen y las causas de la enfermedad aterosclerótica, desde la hipótesis trombogénica hasta la hipótesis lipídica. Sin embargo, la hipótesis de respuesta crónica al daño, propuesta por Ross y Glomset en 1976, es la más ampliamente aceptada en la actualidad. Esta teoría sugiere que las lesiones ateroscleróticas surgen como consecuencia de una lesión en el endotelio vascular, desencadenada por factores como la hipertensión arterial, el tabaquismo, la diabetes y la dislipidemia.

La disfunción endotelial es una condición patológica en la que el endotelio muestra un deterioro de las propiedades antiinflamatorias, anticoagulantes y reguladoras vasculares. En la actualidad se considera un evento crucial en el desarrollo de la aterosclerosis. La OxLDL formada y retenida en el espacio subendotelial activa las

células endoteliales (CE) mediante la inducción de moléculas de adhesión a la superficie celular que, a su vez, provocan el rodamiento y la adhesión de los monocitos sanguíneos y las células T. Se informa que OxLDL induce la expresión de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión de células vasculares 1 (VCAM-1), aumentando las propiedades adhesivas del endotelio de manera similar a los efectos proinflamatorios de citocinas como interleucina 1 beta. (Frostedgord, Haegerstrand, Gidlund, & Nilsson, 1991)

Los leucocitos sanguíneos reclutados migran hacia la túnica íntima, guiados por quimiocinas. De hecho, OxLDL estimula las células endoteliales (CE) y las células musculares lisas (SMC) para que secretan proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) y factor estimulante de colonias de monocitos (mCSF) que inducen el reclutamiento de monocitos en la pared endotelial. Por otro lado, OxLDL puede ser quimiotáctico para monocitos, linfocitos T (ya que posee lisofosfatidilcolina) y también para macrófagos. (Quinn, 1987)

En cuanto al diagnóstico de aterosclerosis, se basa principalmente en estudio de imagen como: la ecografía (US), la resonancia magnética (RM) y la tomografía computarizada (TC), pero dichos estudios solo pueden identificar lesiones avanzadas, además la evaluación de la vulnerabilidad de la placa suele no ser lo suficientemente precisa. Además, los agentes de contraste convencionales solo pueden ayudar en las detecciones morfológicas. Por lo tanto, se necesitan medidas alternativas adicionales para optimizar el diagnóstico temprano. (Cheng et al., 2023)

El tratamiento ateroesclerótico en general se basa en la mejor terapia médica (BMT) y en casos más avanzados de la patología con cirugía. El BMT en general hace referencia a tratamientos hipolipemiantes, antiplaquetarios y/o antitrombóticos, que deben seleccionarse cuidadosamente en función de la condición del paciente. Hoy en día, la estatina se recomienda principalmente para reducir los lípidos circulantes al regular positivamente el receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLr) con la ayuda de la apolipoproteína B (ApoB). Sin embargo, el tratamiento farmacológico a largo plazo causará daño hepático, sangrado gastrointestinal, malestar muscular y arritmia.

Por otro lado, producto de la progresión de la aterosclerosis cuando esta no es diagnosticada ni tratada oportunamente, genera estrechamiento crítico del vaso sanguíneo, producto del crecimiento de la placa lipídica, estrechamiento que restringe severamente el flujo sanguíneo complicación conocida como estenosis grave, en cuyo caso se debe considerar intervención quirúrgica, como endarterectomía, dilatación con balón o implantación de un stent. Estas intervenciones quirúrgicas requiere altas exigencias de los signos vitales del paciente y además pueden resultar en reestenosis posoperatoria o complicaciones hemorrágicas.(Cheng et al., 2023)

Fisiopatología

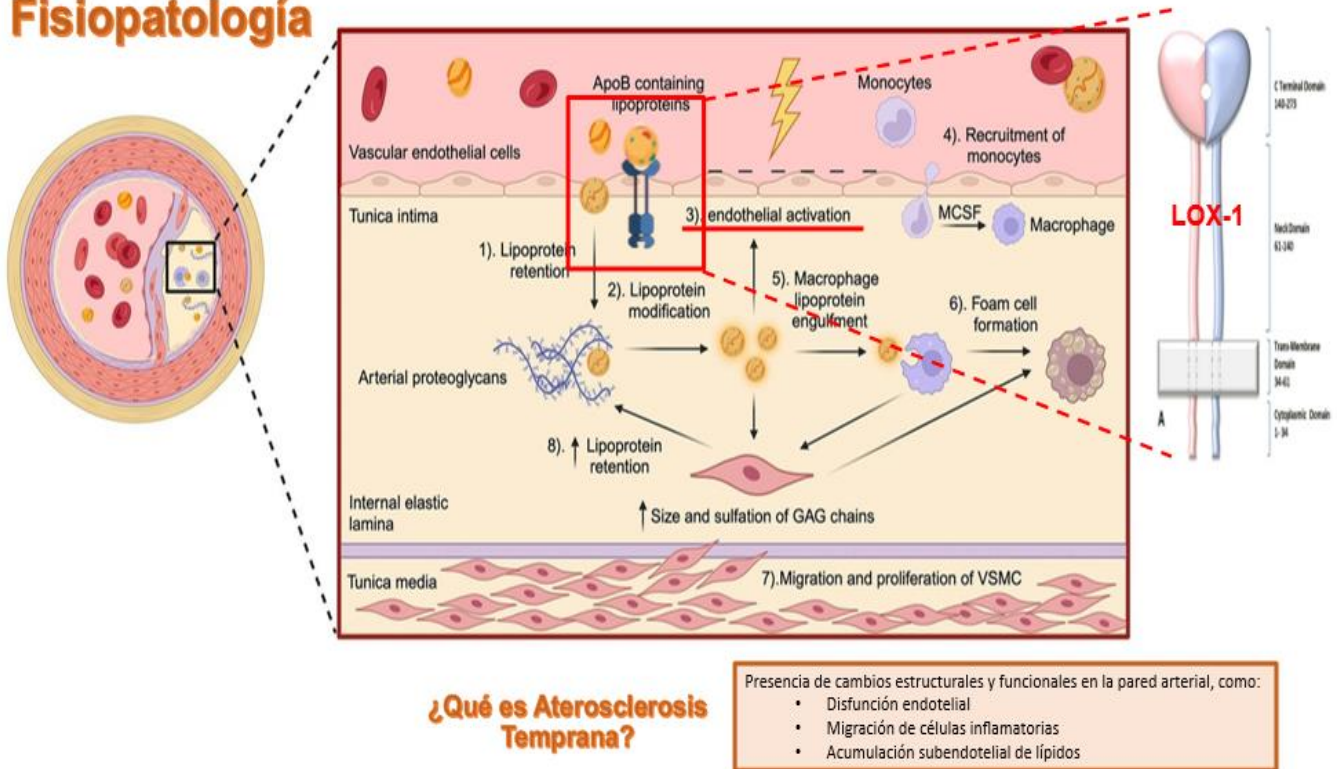


Figura 1: Fisiopatología de la aterogénesis asociada al receptor de lipoproteína de baja densidad LOX-1.

La imagen representa los principales mecanismos moleculares y celulares involucrados en la aterogénesis mediada por la activación del receptor LOX-1 en células endoteliales. Se ilustra la unión de lipoproteínas de baja densidad oxidadas (oxLDL) al receptor LOX-1, lo que desencadena estrés oxidativo, disfunción endotelial, activación de vías proinflamatorias y apoptosis celular, contribuyendo a la formación y progresión de la placa aterosclerótica. Fuente: (Gala Araujo, 2025).

3. Aterosclerosis Temprana:

En la actualidad no se ha definido con certeza el termino aterosclerosis temprana sin embargo hace referencia a la presentación clínica de la misma en personas relativamente jóvenes. El inicio de la enfermedad se considera temprano en hombres menores de 55 años y en mujeres menores de 65 años; dicho rango de edad es muy

ambiguo ya que, desde hace varios años, se propuso un origen fetal para la enfermedad aterosclerótica coronaria. Morfológicamente se describió la presencia de células espumosas en vasos arteriales de recién nacidos y se señaló a la disfunción endotelial como un evento temprano importante en la aterogénesis; además se demostró que el proceso aterogénico comienza en los fetos humanos tras la oxidación de las LDL durante la vida fetal relacionada con la hipercolesterolemia materna, siendo la llegada de los macrófagos un evento subsiguiente asociado con la disfunción endotelial ampliamente reconocida y evidenciada en niños y adultos como factor de riesgo para la aterosclerosis. (Mejías & Suárez., 2002)

Desde el punto de vista morfológico, las arterias presentan engrosamientos adaptativos en localizaciones definidas desde el nacimiento, como una respuesta autolimitada de la íntima a fuerzas hemodinámicas, las cuales son las primeras áreas que evolucionan hacia lesiones más avanzadas. En estas áreas, ha sido detectada la presencia de células inflamatorias, interleucina-1-, interleucina-2 y el factor de necrosis tumoral α (gTNF) en el citoplasma de las células infiltrantes, lo que sugiere un mecanismo de hipersensibilidad mediado por células, como un evento importante para el desarrollo de la aterosclerosis así como alteraciones en la expresión de los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad clase II en las células musculares y en las células inflamatorias, elementos que podrían contribuir a la perpetuación de la reacción autoinmune aterogénica. (Mejías & Suárez., 2002)

Un estudio realizado en el año 2023 investigo la dinámica temprana de la enfermedad aterosclerótica subclínica dentro de una cohorte de 3.471 individuos en total con edad inicial de 40 a 55 años; 36 % mujeres), a los cuales se les realizaron 3 evaluaciones seriadas de ultrasonido vascular tridimensional multiterritorial (3DVUS) de arterias periféricas en intervalos de 3 años. La aterosclerosis subclínica se cuantificó como volumen de placa global (mm³) (carga de placa femoral y carótida bilateral). Se desarrollaron modelos de regresión logística multivariable para progresión y regresión utilizando selección de variables progresiva. (Guiomar Mendieta MD, y otros, 2023)

Como resultado del estudio anterior los investigadores determinaron que la progresión de la aterosclerosis subclínica desde el inicio hasta los 6 años ocurrió en el 32,7% de la cohorte (el 17,5% presentó enfermedad incidente y el 15,2% progresó desde la enfermedad prevalente al momento del reclutamiento). Se observó regresión en el 8,0% de aquellos pacientes con enfermedad al inicio. Los efectos del colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL-C) más alto y la presión arterial sistólica (PAS) elevada en el riesgo de progresión de la aterosclerosis subclínica a los 6 años fueron más pronunciados entre los participantes en el estrato de edad más joven. (Guiomar Mendieta MD, y otros, 2023)

Se ha evidenciado que la regresión de la aterosclerosis es posible en las primeras etapas de la enfermedad. El impacto del colesterol LDL y la presión arterial sistólica en la progresión de la aterosclerosis subclínica fue más pronunciado en los participantes

más jóvenes, un hallazgo que sugiere que la prevención de la aterosclerosis y su progresión podría mejorarse mediante un control más estricto de los factores de riesgo a edades más tempranas, con un probable impacto a largo plazo en la reducción del riesgo de eventos clínicos. (Guiomar Mendieta MD, y otros, 2023)

En conclusión, los estudios relacionados a la aterosclerosis temprana han revelado que la enfermedad puede originarse incluso en la vida fetal, con la disfunción endotelial y la oxidación de LDL como eventos clave en su desarrollo. Morfológicamente, las arterias presentan engrosamientos adaptativos desde el nacimiento, los cuales pueden evolucionar hacia lesiones avanzadas con la participación de células inflamatorias y mecanismos inmunológicos. Investigaciones recientes han demostrado que la aterosclerosis subclínica progresa en un porcentaje significativo de individuos jóvenes, especialmente en aquellos con niveles elevados de colesterol, también se ha evidenciado que la regresión de la enfermedad es posible en sus primeras etapas, lo que resalta la importancia del control temprano de los factores de riesgo para prevenir la progresión y reducir la incidencia de eventos cardiovasculares a largo plazo.

4. Modelos experimentales para el estudio de la aterogénesis

A pesar de que la aterosclerosis se desarrolla lenta y silenciosamente, hasta el día de hoy hay una ausencia de modelos experimentales adecuado para estudiar la enfermedad cardiovascular considerando su largo progreso, lo que dificulta estudiar los tratamientos para la aterosclerosis en etapa temprana y no permiten tener una idea clara

de su complejidad *in vivo*, a lo largo de la vida de un individuo y en un entorno fisiológico real. Muchos de estos modelos emplean animales a los que se les induce la enfermedad mediante una dieta rica en lípidos. Además, se han creado modelos genéticamente modificados y se han utilizado modelos celulares para evaluar los efectos de agentes pro y anti aterogénicos (Leong *et al.*, 2015).

Entre las principales limitaciones en los estudios *in vivo* enfocados en la aterosclerosis, principalmente con animales murinos, están el tiempo y el costo requerido para desarrollar con precisión un modelo animal que imite la complejidad de la enfermedad humana. Para superar este problema, se requiere de un modelo vertebrado *in vivo* que permita la disponibilidad suficiente de individuos, en periodos de tiempo acotados, que sea fácil de manipular y a un costo relativamente bajo.

Con el tiempo, diferentes modelos no murinos se han desarrollado para el estudio de la enfermedad aterosclerótica en diversos animales, tales como: nemátodos (*Caenorhabditis elegans*), ranas (*Xenopus laevis*), embriones de pollo (*Gallus gallus*) y pez cebra (*Danio rerio*). Sin embargo, algunos de estos modelos presentan diferencias significativas en la distribución y composición de las lipoproteínas en comparación con los humanos, lo que limita su utilidad para replicar la fisiopatología humana. (Fuentes., 2024)

El ratón se ha convertido en el modelo animal más utilizado en la investigación de la aterosclerosis debido a su bajo costo, alta prolificidad y facilidad de manipulación, pero

deficientes de ApoE/LDLR y los animales alimentados con una dieta rica en colesterol, exacerban la inflamación y favorecen respuestas adaptativas de los animales; desde el punto de vista del metabolismo de lipoproteínas, los ratones tienen una deficiencia en proteínas importantes como la transferidora de ésteres de colesterol y Apo (a) y predominan en lipoproteínas de alta densidad (HDL) lo cual no refleja el proceso en humanos. Aunque los modelos murinos presentan diferencias en las lesiones ateroscleróticas en comparación con los humanos, siguen siendo útiles para explorar los mecanismos moleculares de la enfermedad. Además, la posibilidad de realizar transgénesis y mutación dirigida en ratones los convierte en una herramienta poderosa en la investigación de la aterosclerosis. (Chen, Qin, & Liu, 2019)

El uso del ratón en la investigación científica es invaluable debido a su reproducción eficiente, breves ciclos generacionales y mantenimiento económico. Estos animales son notables por sus líneas puras con fenotipos genéticamente transmisibles y su notable resistencia a la aterosclerosis. La cepa C57BL/6J ha sido fundamental en los estudios de aterosclerosis que se inducen mediante dietas ricas en grasas saturadas y colesterol, además de ácido cólico. La adaptación de este modelo ha mejorado con el desarrollo de la tecnología transgénica y la manipulación genética, lo que ha propiciado progresos significativos en la simulación de enfermedades humanas. (Chen, Qin, & Liu, 2019)

Las ratas son comúnmente empleadas en la investigación de laboratorio, particularmente en el estudio de lipoproteínas y arteriosclerosis, gracias a su

mantenimiento económico y su capacidad para soportar procedimientos quirúrgicos complejos. No obstante, diferencias en el metabolismo lipoproteico entre ratas y humanos restringen su aplicabilidad en ciertos estudios relacionados con la aterosclerosis. Estos animales, que predominan en HDL y carecen de CETP y Apo (a), tienen un metabolismo que favorece una mayor conversión de colesterol en ácidos biliares ante dietas altas en colesterol, lo que le otorga una resistencia natural al hipercolesterolemia. Además, las ratas solo desarrollan aterosclerosis cuando son alimentadas con dietas altamente enriquecidas. Entre las variedades de ratas, las RICO y las Zucker obesas son modelos utilizados para investigar el hipercolesterolemia y el síndrome metabólico, respectivamente. (Ouguerram & Magot, 1991)

Estos animales transgénicos ya por ser modificados genéticamente no son un modelo fiable de la patología ya que el factor genético también es determinante para el desarrollo de la enfermedad y la formación de placas o depósitos de lípidos se vuelve un proceso más forzado y alejado de la progresión “normal”.

1.1. Modelo *Danio rerio*

Por otra parte, el pez cebra (*Danio rerio*) ha demostrado ser un excelente modelo para evaluar y caracterizar la aterosclerosis *in vivo*, ya que estos animales desarrollan hipercolesterolemia muy fácilmente debido a su alta capacidad para absorber colesterol. Aunque su anatomía vascular difiere de la de los mamíferos, el pez cebra ha surgido como un modelo experimental emergente ya que ofrece ventajas únicas, como su

transparencia óptica durante las etapas tempranas del desarrollo y una numerosas progeñie de desarrollo externo, lo que permite la observación directa de los procesos de formación de placas ateroscleróticas Además, la manipulación genética en el pez cebra es relativamente sencilla lo que facilita la investigación sobre los mecanismos subyacentes de la aterosclerosis (Fang, Liu, & Miller, 2014)

El pez cebra (*Danio rerio*) ha emergido como un recurso valioso y versátil en numerosos campos científicos. Originario de aguas tropicales de agua continentales, el pez cebra es un organismo de pequeño tamaño con un ciclo de vida corto y una alta tasa de reproducción, lo que lo convierte en un modelo biológico ideal para estudiar la aterogénesis. Kimmel *et al* (1995) definieron las etapas del desarrollo embrionario y larval en el pez cebra en horas post fecundación (hpf), definiendo así una escala estándar de desarrollo a 28,5°C, lo que es posible debido a la alta sincronicidad con que ocurre la embriogénesis de esta especie a temperaturas constantes. Esta uniformidad en las condiciones de crecimiento del pez que han podido ser replicadas por varios grupos de científicos ha permitido generar información morfológica, bioquímica y fisiológica en todas las etapas del ciclo de vida del pez cebra, tanto en el desarrollo embrionario y larval, como en juveniles y adultos de ambos sexos de esta especie.

Las larvas se vuelven activas después de 3-5 días de ser fecundadas, y llegan a la madurez sexual alrededor de los 3 meses. La rapidez en la que se reproduce esta especie es una de las razones por las cuales es tan atractiva para la investigación científica. El pez cebra se destaca por su sistema inmune avanzado, el cual comparte y

presentan similitudes con los humanos, destacan los macrófagos y neutrófilos por su importancia y características morfológicas y funcionales que se asemejan a las que se observan en mamíferos. (Crowhurst, Layton, & Lieschke., 2002)

Así como los mamíferos, los teleósteos también tienen diversos tipos de granulocitos y un linaje distinto de macrófagos. El neutrófilo es el granulocito más común en el pez cebra y se distingue por su núcleo segmentado con 2 a 3 lóbulos. Este ejemplo de célula se asemeja al neutrófilo humano ya que también presenta un núcleo con varios lóbulos y un citoplasma heterofílico. A medida que el neutrófilo se desarrolla, sus gránulos también se desarrollan, liberando y almacenando múltiples enzimas esenciales para su desempeño. La actividad histoquímica de la mieloperoxidasa en los heterófilos del pez cebra muestra la presencia de la enzima peroxidasa en las células de los peces. (Crowhurst, Layton, & Lieschke., 2002) Diversas investigaciones indican que los neutrófilos polimorfonucleares son las células inmunitarias innatas más abundantes, siendo el tipo de glóbulo blanco predominante en larvas de pez cebra a los 2 días de la fecundación, y también en mamíferos adultos (Trede *et al.*, 2004).

Los neutrófilos, un tipo de glóbulos blancos polimorfonucleares, son los primeros en llegar a las zonas inflamadas. La detección y medición de neutrófilos en tejidos se ha empleado extensamente como un marcador de inflamación en peces cebra, utilizando herramientas como pruebas citoquímicas y tinciones para visualización histológica. (Hernández, 2019) describen la tinción Sudan Black B como un colorante que tiene

afinidad por fosfolípidos y esteroides, es insoluble en agua y puede teñir el citoplasma, lípidos neutros, fosfolípidos y colesterol de marrón oscuro a negro (Wang *et al.*, 2015).

La coloración de los numerosos gránulos en los neutrófilos es más notable que en las células de otros tipos, lo que la convierte en una herramienta útil para identificar la presencia de granulocitos y evaluar posibles reacciones inflamatorias. Por otra parte, existen múltiples líneas transgénicas de pez cebra que expresan proteínas fluorescentes bajo el control de promotores de genes específicos como el de la mieloperoxidasa (mpx) o el del gen marcador de macrófagos mpeg1 (Ellet *et al.*, 2010; Harvie *et al.*, 2013), permitiendo evaluar la presencia y migración de neutrófilos en el animal vivo (Renshaw *et al.*, 2016).

Tanto el pez cebra (*Danio rerio*) como el ratón (*Mus musculus*) han surgido como modelos animales valiosos para el estudio de la aterogénesis. Cada uno ofrece ventajas únicas que complementan y amplían nuestra comprensión de este proceso complejo, ya que el hipercolesterolemia observado en estos animales en términos de distribución de lipoproteínas es similar a la distribución observada en pacientes con dislipidemia. Además, los genes asociados con el metabolismo lipídico se conservan entre humanos y peces, así se ha demostrado que ellos expresan SRA1, CD36, TLR4, LDLr, LRP-1 y ABCA-1 (Otis, y otros, 2005).

El pez cebra y los humanos comparten similitudes en la manera en que absorben el colesterol en el intestino. El pez cebra tiene una versión de la proteína humana

Niemann-Pick C1 (NPC1L1) llamada Npc1l1, que juega un papel en la absorción y transporte de colesterol en el intestino y es el blanco de la ezetimiba, un medicamento para reducir el colesterol. Los ácidos grasos presentes en la alimentación facilitan la captación de colesterol en el intestino al cambiar rápidamente la ubicación de Npc1l1 en el borde del cepillo intestinal (Walters et al 2012).

La alimentación durante 10-14 días de larvas de pez cebra con una dieta alta en colesterol (4% o 8% de colesterol) resulta en hipercolesterolemia, acumulación de lípidos en la pared vascular, alteración de células endoteliales, aumento de la permeabilidad vascular, reclutamiento de células inflamatorias y activación de fosfolipasa A2 (Stoletov *et al.*, 2009). Por otra parte, dado que estos animales exhiben un grado de transparencia durante el desarrollo, es un modelo ideal para monitorear la absorción de lípidos, angiogénesis, activación del sistema inmune y la formación de células de espuma. Además, la transparencia óptica en estados embrionarios y larvales, permite obtener imágenes de proteínas y sondas fluorescentes en tiempo real como ésteres de colesterol fluorescente (rojo) o células endoteliales marcadas en modelos de pez cebra transgénicos como la línea reportera Tg (fli1: EGFP) (Han *et al* 2021).

Los eventos ateroscleróticos se desarrollan más rápidamente en el pez cebra en comparación con otros modelos animales, por lo que este modelo permite una progresión adecuada del fenómeno aterogénico. En forma importante, alrededor del 70% de los genes identificados en humanos tienen al menos un ortólogo de pez cebra y los genes asociados con la ECV en humanos se conservan con los genes ortólogos de este pez

Por lo tanto, no sorprende que una amplia gama de medicamentos cardiovasculares para humanos usados en la práctica clínica diaria tiene efectos análogos en el corazón y los vasos sanguíneos del pez cebra, validando el uso del pez cebra como modelo en la investigación cardiovascular (Khor & Noor, 2019)

Asociado a su uso para estudio de la aterosclerosis, se ha visto que se puede utilizar además para el análisis de agentes terapéuticos. En el estudio de la respuesta celular al estrés en organismos acuáticos, las proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins, HSP) desempeñan un papel fundamental como marcadores de daño celular y mecanismos de adaptación. Entre ellas, la familia HSP70 constituye uno de los grupos más conservados evolutivamente y se caracteriza por su rápida inducción frente a diversos estímulos estresantes, como cambios de temperatura, radiación o exposición a compuestos químicos. Estas proteínas actúan como chaperonas moleculares que facilitan el plegamiento correcto de proteínas recién sintetizadas, previenen la agregación de proteínas mal plegadas y participan en procesos de transporte y degradación proteica, contribuyendo así al mantenimiento de la homeostasis celular. (Yamashita et al., 2010)

En peces, la expresión del gen hsp70 se activa principalmente mediante factores de transcripción sensibles al estrés, lo que permite una respuesta rápida frente a alteraciones ambientales o metabólicas. Debido a esta propiedad, se han desarrollado líneas transgénicas de pez cebra que expresan proteínas fluorescentes bajo el control del promotor hsp70, como el modelo hsp70:GFP, el cual permite visualizar in vivo la

activación de la respuesta al estrés en tejidos específicos durante el desarrollo embrionario y larval. Este sistema se ha convertido en una herramienta útil para estudiar mecanismos de toxicidad, estrés celular y efectos de compuestos bioactivos en vertebrados, ya que la activación del promotor hsp70 se correlaciona directamente con la presencia de estrés fisiológico o daño celular en el organismo.(Yamashita et al., 2010)

En resumen, el pez cebra se ha consolidado como un modelo biológico versátil en la investigación de la aterosclerosis debido a su rápido desarrollo, alta reproducibilidad y similitudes genéticas y fisiológicas con los humanos. Su sistema inmunológico avanzado, la conservación de genes asociados al metabolismo lipídico y su capacidad para desarrollar hipercolesterolemia lo convierten en una herramienta clave para estudiar los procesos inflamatorios y aterogénicos. Además, su transparencia embrionaria permite la visualización en tiempo real de eventos celulares y moleculares, facilitando el monitoreo de la absorción de lípidos y acumulación de células inflamatorias. Estas características hacen del pez cebra un modelo ideal para investigar la progresión y regresión de la aterosclerosis, así como para evaluar nuevas estrategias terapéuticas en enfermedades cardiovasculares.

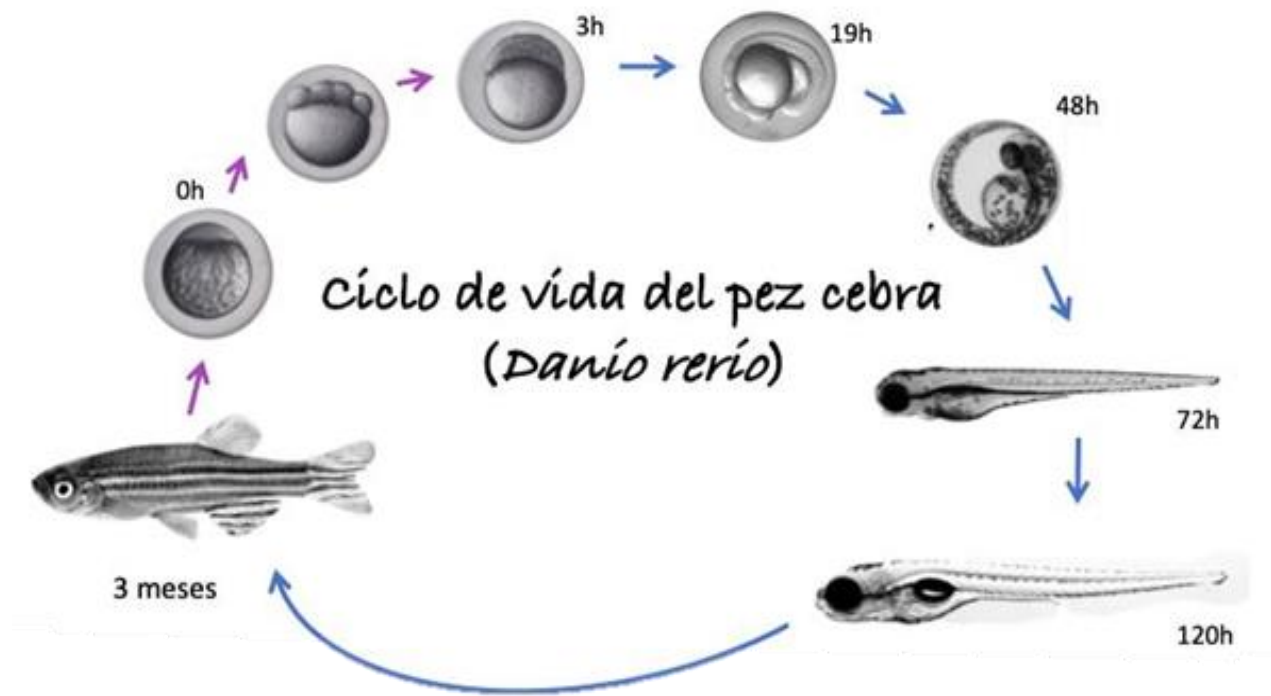


Figura 2: Ciclo de vida del pez cebra (*Danio rerio*) desde el estadio embrionario hasta el pez adulto.

La imagen muestra las diferentes etapas del desarrollo del pez cebra, iniciando desde el estadio embrionario, seguido por las fases larvaria y juvenil, hasta alcanzar la etapa adulta. Este modelo biológico es ampliamente utilizado en investigaciones biomédicas debido a su rápido desarrollo, transparencia embrionaria y similitud genética con los seres humanos. Fuente: (J.De la Paz,2021.)

5. Prevención de la aterosclerosis

Actualmente existe una necesidad urgente de desarrollar un método terapéutico preciso y eficiente para reducir las reacciones adversas y mejorar el rendimiento del tratamiento para la aterosclerosis, buscando el que sea más propicio para mejorar el cumplimiento del paciente y mejorar el pronóstico. Además, se busca una intervención

temprana para minimizar los factores de riesgo y sobre todo para mejorar la calidad de vida de las personas.

En los últimos años las investigaciones in silico se han convertido en una herramienta de búsqueda de las terapias más específicas con la posibilidad de intervención precisa y sobre todo en etapas iniciales de muchas patologías de gran incidencia y tasas de mortalidad como lo son las enfermedades cardiovasculares. Dentro de la investigación in silico surge el término Virtual screening (VS) que se define como una estrategia bioinformática basada en el uso de base de datos de compuestos con estructura conocida para identificar moléculas novedosas frente a un objetivo biológico con estructura conocida; tiene una serie de pasos secuenciales donde se comienza con una gran cantidad de moléculas las cuales se reducen sistemáticamente en número en base a las mejores afinidades y capacidad de interacción.

En general, para los estudios in silico de VS se usan dos enfoques: el primero basado en ligandos (LBVS) que usa información de estructura-actividad de un conjunto de compuestos activos conocidos para identificar nuevas moléculas potencialmente activas, y el segundo basado en estructura (SBVS) que usa la estructura del objetivo biológico obtenida mediante técnicas experimentales como cristalografía y difracción rayos X, resonancia magnética nuclear (RMN) o modelamiento molecular, para evaluar la capacidad de unión a través de simulaciones de acoplamiento (docking) proteína-ligando y luego clasificar las moléculas según su afinidad de unión predicha y el cálculo de puntajes estructurales (score). (Concha, 2023)

En el 2023 Morales utilizó la estrategia de virtual screening basado en la estructura receptor de lipoproteínas de baja densidad (LOX-1) el cual es determinante en el inicio de la disfunción endotelial que a su vez marca una etapa temprana de la aterosclerosis en humanos. Además, se obtuvieron a lo menos 7 moléculas como potenciales inhibidores de Lox-1, dentro de los cuales se encuentra el Aloe emodina. Lo que constituyó un primer paso para el desarrollo de futuros fármacos capaces de prevenir la aterosclerosis u otras enfermedades mediadas por receptor. (Concha, 2023)

6.- Aloe emodina (AE)

El aloe emodina (AE) tiene una rica historia en la medicina tradicional como un ingrediente activo de hierbas chinas como *Cassia occidentalis*, *Rheum palmatum* L., Aloe vera y *Polygonum multiflorum* Thunb y es apreciada por su accesibilidad, seguridad, asequibilidad y eficacia; además cuenta con múltiples propiedades bioquímicas y farmacológicas, como fuertes efectos antibacterianos, antioxidantes y antitumorales. A pesar de su variedad de beneficios, la identidad de la AE como un derivado de la antraquinona plantea inquietudes sobre su potencial toxicidad hepática y renal. Sin embargo, se ha considerado un candidato prometedor a fármaco debido a sus importantes bioactividades y rentabilidad. Investigaciones recientes han destacado que la AE nanoformulada puede mejorar la administración de fármacos, la biocompatibilidad

y los beneficios farmacológicos, ofreciendo un enfoque novedoso para el diseño de fármacos.

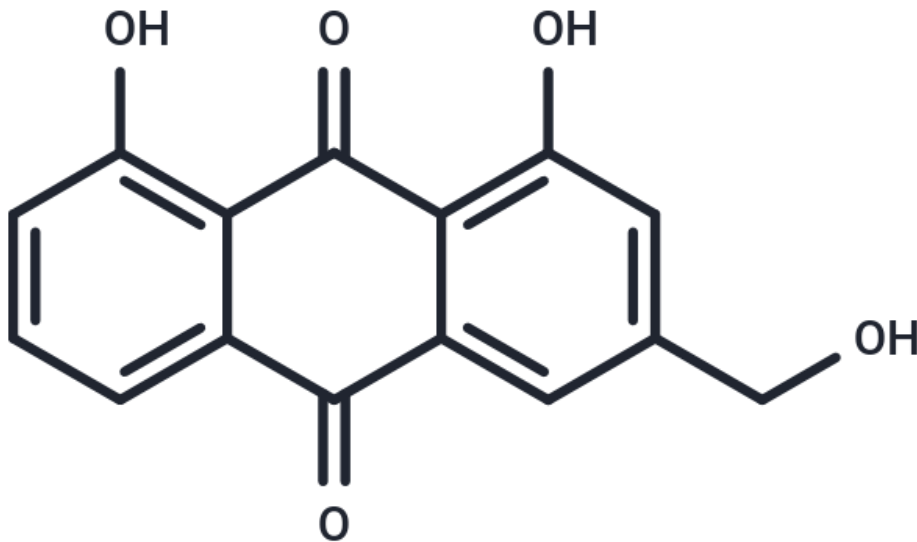


Figura 3: Estructura química de la Aloe-emodina.

La imagen presenta la estructura química de la Aloe-emodina, un compuesto perteneciente a la familia de las antraquinonas, caracterizado por su núcleo aromático policíclico y grupos funcionales hidroxilo. Este compuesto ha sido estudiado por sus propiedades biológicas, incluyendo efectos antiinflamatorios, antioxidantes y su potencial modulador de rutas moleculares asociadas a enfermedades cardiovasculares. Fuente: (Target Moi, 2026).

Revisión realizada en el año 2024 profundiza en los impactos farmacológicos, los mecanismos, la farmacocinética y el perfil de seguridad de la AE, incorporando conocimientos de estudios sobre sus nanoformulaciones cuyo objetivo es describir la creciente investigación en esta área y apoyar el desarrollo y la utilización continuos de terapias basadas en EA. (Luo, y otros, 2024)

Químicamente, el AE es una hidroxiantraquinona que se encuentra en el aloe vera, así como en las hojas y raíces de otras plantas, generalmente en combinación con sus glucósidos o en forma reducida de antrona. AE es estructuralmente muy similar a la emodina. Conocida químicamente como 1,8-dihidroxi-3-hidroximetil-antraquinona. En 2020 se realizó revisión sistemática de los efectos asociados al uso de aloe emodina en la medicina tradicional en países orientales; identificándose efectos antineoplásicas importantes en diferentes tipos de cáncer al inducir expresión de p53 asociada con detección del ciclo celular en células cancerosas, antiinflamatoria suprimiendo la expresión de IL-6 y IL-1B, antiparasitaria en parásitos del género leishmania mediante activación de macrófagos y recientemente otros estudios revelan su posible actividad cardiovascular en disminución de los depósitos lipídicos en la placa de ateroma. Si bien los efectos citotóxicos no están claros su estudio ha aumentado en la última década. (C. Cárdenas, 2006). (Xiaoxv Dong, 2020)

En el año 2022 se demostró el efecto anti aterosclerótico de Aloe emodina cuyo objetivo de este estudio fue dilucidar los efectos farmacológicos de derivados de aloe emodina (DAE) y los mecanismos subyacentes a la aterosclerosis, los investigadores descubriendo el papel inhibidor del DEA en la patogénesis de la aterosclerosis en ratones ApoE -/-, atribuible en parte a la disminución del contenido lipídico acumulado en la aorta de estos ratones, además se evidenciaron la disminución en el contenido de colágeno y la infiltración de macrófagos en el tejido aórtico. En este estudio se evidencio que este derivado de AE promovía la autofagia endotelial mediante la regulación positiva de la

expresión de AMBRA1 in vivo; los autores sugirieron el potencial del AE y sus derivados como nuevo agente terapéutico para el tratamiento de la aterosclerosis. (Xueqing Tang, 2022)

6. Pez cebra y Aloe emodina.

Son escasas las evidencias que asocian el uso de aloe emodina en modelos animales de aterosclerosis; sin embargo, un estudio realizado en el año 2019 evaluó el efecto hepatotóxico y mecanismo subyacente de Aloe emodina en larvas de pez cebra, en el cual se analizaron secciones del hígado de larvas de pez cebra tratados y no tratados con AE utilizando tinción de Sudan black B. Los resultados de este estudio sugieren que el AE tiene un efecto hepatotóxico en el pez cebra caracterizado por gotas de lípidos y daño tisular a nivel hepático. (Quan, y otros, 2019)

En resumen, el pez cebra es un modelo vertebrado único que no sólo tiene las características de los modelos de invertebrados (pequeño tamaño, potente manejabilidad genética, alta fecundidad, facilidad de mantenimiento, y relativamente bajo costo) sino también la ventaja de presentar una alta conservación con los mamíferos. Por lo tanto, su uso es invaluable para estudiar el desarrollo y fisiología de vertebrados, así como modelo de enfermedades humanas, tales como la aterogénesis y la enfermedad cardiovascular evidenciándose en recientes estudios que el pez cebra puede ser un buen sistema para modelar la enfermedad cardiovascular humana y contribuir significativamente al descubrimiento de fármacos más eficientes y confiables,

con una menor tasa de abandono de fase temprana y tardía y mayores tasas de éxito terapéutico. (Fuentes., 2024)

PROBLEMA

Se desconoce el potencial efecto anti aterogénico de Aloe-emodina y no se cuenta con un modelo mamífero que permita evaluar su efecto en un contexto fisiológico real.

PREGUNTA

¿Cuál es el efecto de Aloe-emodina en los procesos celulares y bioquímicos tempranos asociados al desarrollo de la lesión aterosclerótica temprana inducida por dieta alta en colesterol en un modelo de larva de pez cebra?

HIPÓTESIS

“Aloe emodina previene la acumulación de lípidos e inflamación perivascular, asociada a las lesiones ateroscleróticas en etapas tempranas en un modelo de larva de pez cebra inducido por dieta alta en colesterol”

OBJETIVOS:

Objetivo general

Evaluar el efecto de la Aloe-emodina sobre la acumulación de células inflamatorias, lípidos y parámetros bioquímicos asociados a la aterosclerosis en un modelo de larva de pez cebra alimentada con una dieta alta en colesterol.

Objetivos específicos

1. Establecer las concentraciones sub-tóxicas de Aloe-emodina en larvas de pez cebra.
2. Determinar la acumulación de células inflamatorias y lípidos en larvas de pez cebra alimentadas con dieta alta en colesterol.
3. Analizar el efecto del tratamiento con Aloe-emodina sobre la acumulación de células inflamatorias y lípidos en larvas de pez cebra alimentadas con dieta alta en colesterol.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Aprobación ética

Este estudio se apegó a los lineamientos éticos establecidos por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (ver anexo 2).

2. Modelos animales:

Las larvas de pez cebra fueron criadas y mantenidas en el Laboratorio de Embriotoxicología e Interacción Desarrollo Ambiente (LEIDA) dirigido por la Dra. Javiera De la Paz Montt, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción. Todos los embriones se recolectaron mediante desove natural de peces cebra silvestre, transgénicos de pez cebra hsp70: GFP (referencia Blechinger) y serán mantenidos según protocolos estándar para la especie. La edad de las larvas se expresó en días posfecundación (dpf). (Kimmel, y otros, 1995)

3. Bioseguridad

Debido a la utilización de muestras biológicas para esta investigación, se cumplió con las medidas de bioseguridad necesarias para evitar cualquier accidente y contaminación con ellas, siguiendo el protocolo que entrega MATPEL para el manejo de accidentes con material de riesgo biológico de la Universidad de Concepción. Los

procedimientos realizados en el laboratorio se llevaron a cabo con elementos de protección personal (delantal y guantes). Los materiales ocupados, fueron desechados en los contenedores correspondientes y previamente inactivados con una solución de hipoclorito de sodio al 1%, bajo las normas que estipula el laboratorio de Bioquímica Clínica e Inmunología de la Universidad de Concepción (anexo 1).

4. Mantención de larvas de peces cebra

Los peces cebra adulto de las cepas silvestres (TAB5) y Transgénico hsp70: GFP se mantuvieron en acuarios a 26-28 °C, pH 7,0-7,4, bajo un ciclo de 14:10 horas de luz/oscuridad. Las larvas de pez cebra se obtuvieron por desove natural introduciendo cajas con doble fondo en los tanques de peces adultos reproductores. Estos peces adultos fueron seleccionados cuidando que no hubiesen sido sometidos a estrés o a un desove en la última semana; para así cuidar la calidad y tamaño del desove. Las ovas recolectadas fueron inspeccionadas mediante lupa y se excluyeron las que no estuvieron fecundados, embriones anormales o coagulados. Una vez obtenidos los embriones viables se mantuvieron hasta 5 días post fecundación (dpf) en medio E3 (NaCl 5mM; KCl 0,17mM; CaCl₂ 0,33mM; MgSO₄ 0,33mM) con azul de metileno para evitar contaminación fúngica.

Se seleccionaron 95 ovas y se colocarán en placas Petri por triplicado en las siguientes condiciones: dieta control (DC), dieta control más dietiléter (DC+DE) y dieta control más dietiléter con colesterol al 4% (DC+DE+4%col). Para su desarrollo sincrónico

se utilizó incubadora con fotoperiodo (VELP) a 27-28°C. Diariamente se realizó limpieza a las placas eliminando cualquier impureza que apareciera en el medio, individuos muertos o que presentaran malformaciones (edemas, curvaturas en la notocorda, etc.).

La administración del Aloe emodina en los grupos con diferentes dietas se realizó una vez al día posterior al cambio de agua diario sacando las larvas a placas Petri de vidrio en donde se realizará inmersión por 1 hora con el fármaco y posteriormente se regresaron a las cajas con medio de mantenimiento.

5. Preparación de la dieta

Para la alimentación de las larvas, se preparó dieta con base proteica de harina de pescado (DC) de acuerdo a lo descrito por (Fehrmann-Cartes, y otros, 2019). A partir de la DC, se generó dieta alta en colesterol (DC+DE+4%Col) de acuerdo a lo descrito por (Stoletov, y otros, 2009) brevemente se mezcló el alimento control en una solución de colesterol (Sigma-Aldrich C8667) disuelto en éter dietílico (Sigma), con el objetivo de alcanzar un contenido de colesterol 4% peso/peso en el alimento después de la evaporación solvente. De manera adicional se generó una dieta control-solvente (DC+DE). Las dietas utilizadas fueron pasadas por tamiz de tal forma que el tamaño de partícula sea <200 µm, posteriormente se almacenaron a -20 °C hasta su uso en los ensayos de alimentación.

6. Grupos experimentales:

a. Estudio de toxicidad:

Para la realización del primer objetivo de investigación se utilizó larvas de 48 horas post fecundación las cuales se traspasarán a placa de 6 well, 10 larvas por well para la realización de los experimentos de toxicidad, cada grupo de larvas fue tratado con diferentes concentraciones de Aloe emodina (0.1,0.5,1,2,3,4 μ M) así como control de DMSO (solvente de disolución de AE) y control de medio de trabajo M E3.

Se necesitaron:	10 larvas x cada concentración	60 larvas
	10 larvas control solvente (DMSO)	10 larvas
	10 larvas control negativo (ME3)	<u>10 larvas</u>
	Total: 80 larvas	

Se realizó en duplicado y una vez finalizado cada ensayo, las larvas sobrevivientes serán sometidas a eutanasia.

La mortalidad fue registrada al finalizar el periodo de exposición tomando como único dato para muerte (Ausencia de latido).

Para evaluar posibles alteraciones hepáticas asociadas a acumulación lipídica, se utilizaron larvas de pez cebra de 3 días post-fecundación (dpf) expuestas de forma continua durante 48 horas a diferentes concentraciones de aloe emodina (AE) (0,5; 1 y

2 μM). Debido a que las larvas aún no habían iniciado alimentación exógena, los tratamientos se realizaron en condiciones basales de desarrollo. Finalizada la exposición (equivalente a 5 dpf), se procedió a la disección de los hígados y a la evaluación de depósitos lipídicos mediante tinción Oil Red O. Se incluyó un grupo control incubado únicamente en medio E3, un control de solvente (DMSO) y un control positivo de daño hepático mediante exposición a etanol.

b. Estudio aterogénico:

Para el segundo objetivo de trabajo se utilizaron larvas en estadio larval de 5 dpf los tres grupos de larvas sometidos a diferentes dietas se traspasaron a cajas plásticas de 200 mL con agua filtrada a una temperatura de 27-28 °C, pH 7,0-7,4 y una conductividad de 700-800 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Los grupos DC, DC+DE y DC+DE+4%Col se alimentaron dos veces al día. Para cada grupo se realizó limpieza extrayendo las larvas con una malla de 500 μm y se traspasaron a placas Petri con agua filtrada y bajo microscopio de 40x se eliminó cualquier impureza. Posteriormente, se colocaron las larvas en cajas limpias con agua fresca filtrada del sistema, y luego por la tarde se realizó segunda alimentación y un recambio de un 50% del agua filtrada. Las cajas se mantuvieron en sistema de acuario, repitiendo este procedimiento por 10 días, finalmente, al terminar el periodo de tratamiento, se utilizó choque térmico con cubos de hielo para inducir la anestesia previo a cualquier tratamiento u observación *in vivo*.

Para el tercer objetivo de investigación se utilizarán 90 larvas de pez cebra de 5 días post fecundación (dpf) por grupo. Lo que permitió evaluar todas las respuestas de

interés en paralelo estas larvas serán alimentadas durante 10 días con una dieta control (DC) o una dieta suplementada con un 4% de colesterol (DC+DE+4%Col), diseñada para inducir aterosclerosis, paralelamente se administraron dos concentraciones de Aloe emodina (resultantes del objetivo 1) una vez al día diario durante los diez días de alimentación.

Así, para cada experimento se requirió un total de **360 larvas**, distribuidas en 4 grupos o tratamientos.

Grupo 1: Dieta alta en colesterol (DC+DE+4%Col) sin AE (control).

Grupo 2: Dieta alta en colesterol + Aloe emodina concentración 1 (DC+DE+4%Col+AE0.5 μm).

Grupo 3: Dieta alta en colesterol + Aloe emodina concentración 2 (DC+DE+4%Col +AE1 μm).

7. Administración de Aloe Emodina

Con el objetivo de evaluar el efecto de la administración de aloe emodina sobre la supervivencia de larvas de pez cebra sometidas a una dieta suplementada con colesterol, se realizó un seguimiento de supervivencia durante un periodo de 10 días de alimentación. Las larvas fueron utilizadas desde 5 dpf y alimentadas dos veces al día durante todo el experimento. Se establecieron tres grupos experimentales: larvas

alimentadas con dieta control (DC), larvas alimentadas con dieta suplementada con 4% de colesterol (DC+DE+4%Col), y un grupo alimentado con DC+DE+4%Col que adicionalmente fue tratado con aloe emodina 1 μ M, administrada mediante inmersión durante 1 hora diaria entre los periodos de alimentación.

8. Mortalidad y Determinación de parámetros de crecimiento:

Para evaluar la mortalidad en los grupos experimentales, se registró la cantidad de muertes acumulada de las larvas de pez cebra posterior a cada experimento. Al término del tratamiento se seleccionarán 10 larvas que, tras ser anestesiadas, serán colocadas en placa con metilcelulosa. Se capturarán imágenes de campo brillante con ayuda de una Cámara Réflex Digital 10.2 MP (NIKON, D3000) acoplada al esteroscopio (ZEISS, Stemi 508) con aumento 4x. Las larvas serán fotografiadas desde una vista lateral para medir longitud desde la boca hasta la punta de la aleta caudal. (Han, y otros, 2021)

Para evaluar si la alimentación con una dieta suplementada con colesterol modifica el crecimiento larvario, se evaluó la longitud total (LT) de larvas de pez cebra tras 10 días de alimentación con distintas formulaciones dietarias.

9. Medición de parámetros bioquímicos

Posterior al tratamiento, se seleccionaron 40 larvas de pez cebra por grupo que fueron sacrificadas y lavadas con solución salina enfriada (PBS) y luego homogeneizadas con

270 μ L de solución PBS, para posteriormente centrifugar a 4°C y 2500 rpm durante 10 min. El sobrenadante se usó para determinar la Alanina aminotransferasa (ALT), Aspartato aminotransferasa (AST), Tiempo de protrombina (TP), Albúmina (ALB), Bilirrubina (TBIL), Bilirrubina directa (DBIL), Gamma-glutamyl transferasa (GGT), Fosfatasa alcalina (ALP), Lactato deshidrogenasa (LDH), Glucosa (GLU), Triglicéridos (TG), Colesterol total (TC), Lipoproteínas de alta densidad (HDL), Proteína C reactiva (CRP). Mediante sistema automatizado externo.

10. Conteo de granulocitos

a. Tinciones:

Para la tinción de granulocitos se utilizó el colorante Sudan Black B (SBB). Para su preparación se disolverán 0,6 g de Sudan black B en 200 mL de etanol (EtOH) y se agitaron con calor hasta su completa disolución, posteriormente la solución se pasó por filtro de 0,2 μ m, la solución se mantuvo a temperatura ambiente y oscuridad.

Con el propósito de evaluar la presencia de células granulocíticas como indicador de respuesta inflamatoria, se realizó el conteo de granulocitos en la región de la vena cardinal de larvas de pez cebra sometidas a diferentes regímenes alimentarios previamente teñidos con Sudan Black B (SBB). Para el conteo de granulocitos se analizaron 10 individuos por grupo (N = 10) larvas de pez cebra enteras en un portaobjeto con PBS y cubiertas con un cubreobjetos y se observó en microscopio sin necesidad de tomar fotografías, se realizó conteo en campo completo según aumento de microscopio

a 20x en región ventral a la altura de los vasos intersegmentales para visualizar los granulocitos teñidos con SBB.

b. Observación al microscopio invertido de larvas de pez cebra transgénica hsp70: GFP.

1. Preparación de las larvas de pez cebra hsp70: GFP

- Se inmovilizarán las larvas con tricaína (MS-222, 0.016% p/v) para reducir el movimiento durante la observación.

2. Montaje para microscopía invertida

- Se preparó portaobjetos con un pocillo de metilcelulosa al 1%.
- Se depositaron las larvas sobre la metilcelulosa y se posicionaron cuidadosamente con una pipeta Pasteur o una microespátula.
- Se añadió una gota de medio E3 con tricaína para mantener la inmovilización.

3. Observación y adquisición de imágenes

Se capturarán imágenes en aumento de 10x, 20 y 40x a campo claro y con filtro para GFP.

4. Análisis de imágenes

- Se procesaron las imágenes con ImageJ/Fiji.
- Se cuantificó la intensidad de fluorescencia medida en unidades arbitrarias (UA).

11. Lípidos en hígado de larva de pez cebra.

Después de cada experimento se seleccionaron 10 larvas de cada tratamiento para la visualización de gotas de lípidos en el hígado. Esto se realizó fijando las larvas de pez cebra previamente incorporando cada larva en tubo eppendorf de 2 ml con 1ml de formalina (FA) 10% durante toda la noche.

La acumulación de lípidos fue determinada mediante tinción, en donde se observó la acumulación de gránulos de lípido utilizando aceite red-O (RO). Para la preparación del RO se disolvió 0,05 g en 10 mL de Propilenglicol 100% (PG) y se agitó hasta su completa disolución. Luego de eso, se filtró la solución con una malla de 300 μm y se utilizó inmediatamente (Anexo 5 y 6).

Posteriormente se extrajeron los hígados bajo lupa y con ayuda de agujas de disección elaboradas con alfileres entomológicos y pinzas. Una vez obtenidos los hígados, se procedió al montaje de grupos de no más de 5 hígados en un portaobjeto, inmersos en glicerol 80%, y tras cubrirlos con un cubre objeto, se sellaron de tal forma que se mantuvieran en el tiempo. Para el análisis de gránulos fue necesaria la obtención de imágenes, las que se realizaran con un microscopio de campo claro (UPRIGHT) con un aumento de 100x. Se obtendrán fotografías por cada hígado con distintos planos de enfoque fino, para poder considerar los gránulos de lípido presentes en la profundidad de todo el tejido.

El procesamiento de imágenes se realizó con el software gratuito ImageJ; las imágenes fueron convertidas a 8 bits y binarizadas para determinar la cantidad de gotas lipídicas ocupada por negro (gránulos) o blanco (vacío) al seleccionar una región específica. (Anexo 7)

12. Análisis estadístico.

Previa aplicación de pruebas de normalidad Shapiro- Wilk y homocedasticidad con test de Barlett, se usó una prueba t de Student para determinar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Se usó corrección de Bonferroni para ajustar comparaciones múltiples (al menos tres experimentos independientes en todos los casos). Los resultados se expresaron como media $\pm$ SD. Se comparará las medidas entre tratamientos de cada caso, siguiendo estadística paramétrica por medio de test ANOVA o no paramétrica utilizando la prueba ANOVA de una vía, en caso de que los datos que no cumplieron con distribución normal, se realizó prueba de Kruskal-Wallis. Se consideró significativo el valor de $p < 0,05$. Para todos los análisis se utilizó el software GraphPad Prism, LLC (versión 8.0.2).

RESULTADOS

Determinación de la concentración sub tóxicas de Aloe emodina en larvas de pez cebra.

Con el objetivo de determinar las concentraciones sub-tóxicas de aloe-emodina para su posterior uso experimental, se evaluó el efecto letal de este compuesto en larvas de pez cebra (*Danio rerio*) de 3 días post-fecundación (dpf).

Los resultados del ensayo de toxicidad aguda en larvas de pez cebra expuestas a aloe emodina indicaron que, bajo las condiciones evaluadas, no se evidenciaron cambios relevantes en la supervivencia entre los distintos tratamientos durante los periodos de exposición analizados. Paralelamente, se registraron los efectos subletales a 24 y 48 horas de exposición continua a las diferentes concentraciones de Aloe-emodina, considerando parámetros morfológicos y conductuales tales como ausencia de movimiento, postura anormal, flotación anormal, edema o hinchazón extrema y curvatura severa de la columna vertebral. A las 24 horas, no se observaron alteraciones subletales en ninguna de las concentraciones evaluadas ni en los controles (Figura 4, **Tabla 1**). De manera consistente, a las 48 horas no se evidenciaron efectos subletales en la mayoría de los tratamientos; sin embargo, en la concentración de aloe emodina 4 μM se registró ausencia de movimiento en 3 de 10 larvas tras la exposición continua (**Tabla 2**).

A partir de estos datos, fue posible estimar la concentración letal media (LC_{50}) y establecer un rango seguro de concentraciones sub-tóxicas para estudios posteriores en donde se observó una relación dosis-dependiente, con ausencia de mortalidad en concentraciones inferiores a 3 μM , mortalidad del 50 % (LC_{50}) a 4 μM y mortalidad del 100 % en concentraciones iguales o superiores a 5 μM .

Tabla 1: Efectos subletales en larvas de pez cebra a las 24 horas de exposición continua de Aloe emodina.

***Efectos subletales en larvas de pez cebra a las
24 horas de exposición continua***

Tratamiento	Ausencia de movimiento.	Postura anormal	flotación anormal	Edema o hinchazón extrema.	Curvatura severa de la columna vertebral.
Medio E3	0	0	0	0	0
DMSO	0	0	0	0	0
0.001%					
AE 0.1 μ M	0	0	0	0	0
AE 0.5 μ M	0	0	0	0	0
AE 1 μ M	0	0	0	0	0
AE 2 μ M	0	0	0	0	0
AE 3 μ M	0	0	0	0	0
AE 4 μ M	0	0	0	0	0

0: No se observa.

Tabla 2 :Efectos subletales en larvas de pez cebra a las 48 horas de exposición continua de Aloe emodina.

***Efectos subletales en larvas de pez cebra a las
48 horas de exposición continua***

Tratamiento	Ausencia de movimiento.	Postura anormal	flotación boca arriba o lateral.	Edema o hinchazón extrema.	Curvatura severa de la columna vertebral.
Medio E3	0	0	0	0	0
DMSO	0	0	0	0	0
0.001%					
AE 0.1 μ M	0	0	0	0	0
AE 0.5 μ M	0	0	0	0	0
AE 1 μ M	0	0	0	0	0
AE 2 μ M	0	0	0	0	0
AE 3 μ M	0	0	0	0	0
AE 4 μ M	3	0	0	0	0

0: No se observa.

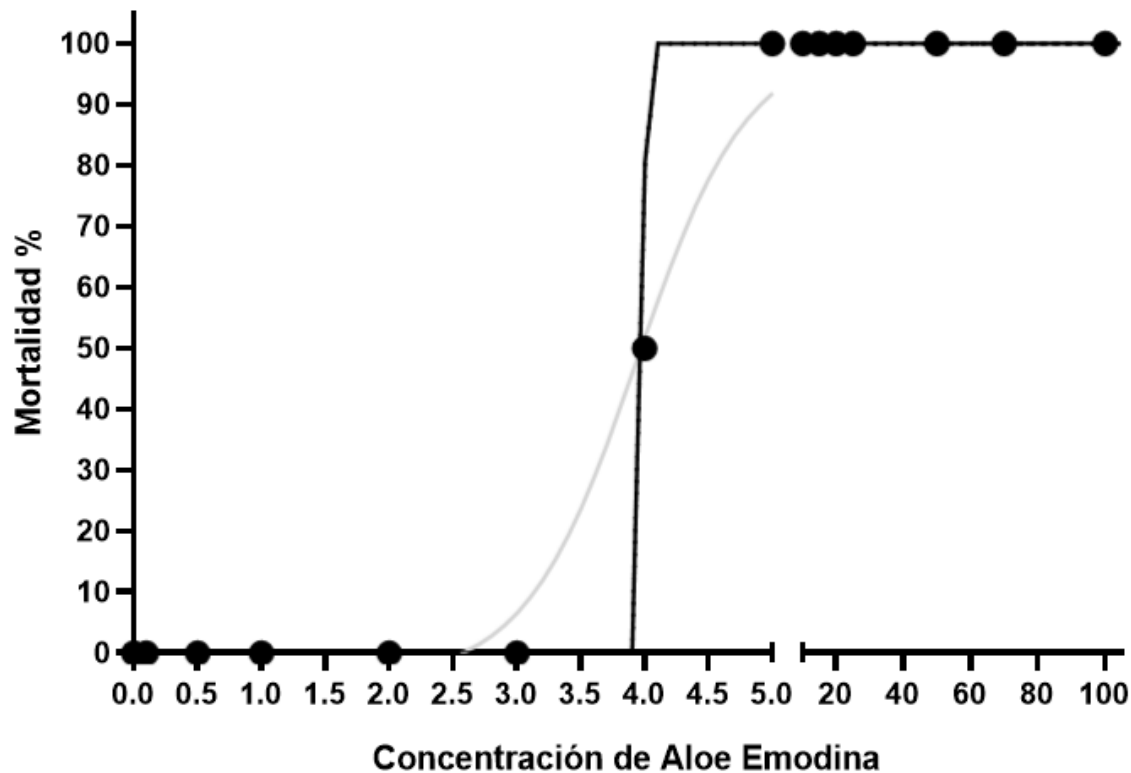


Figura 4 Curva de mortalidad en larvas de pez cebra expuestas Aloe-emodina.

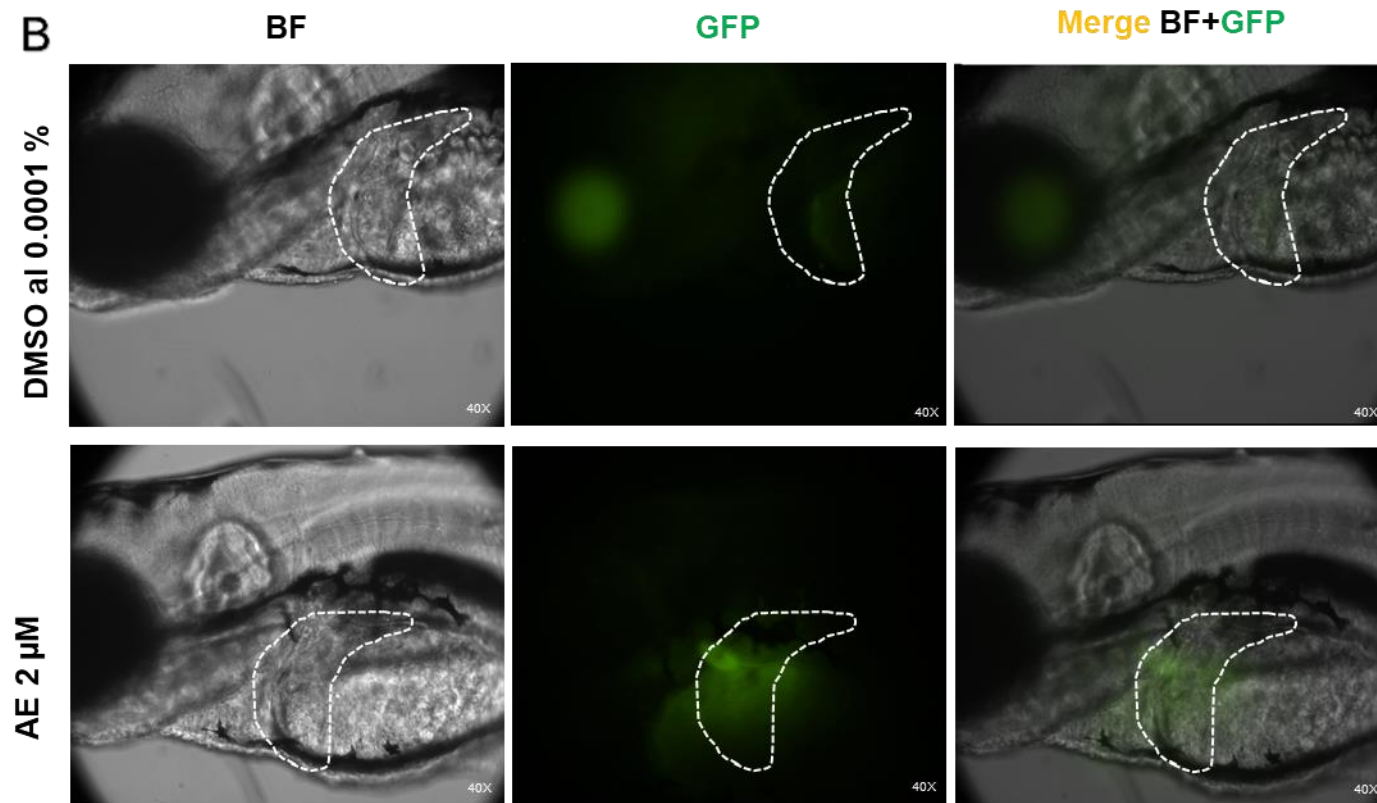
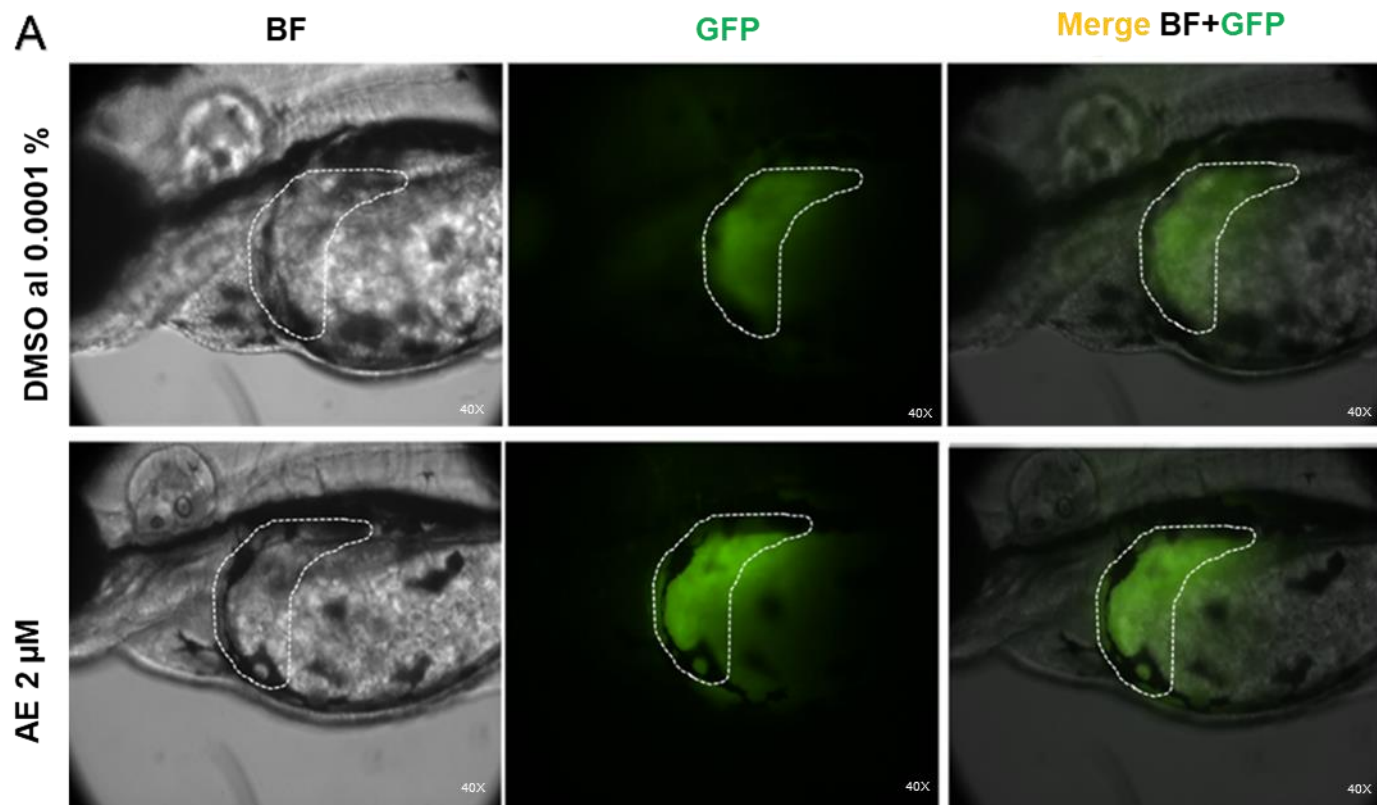
Gráfico muestra el efecto de la aloe-emodina sobre la mortalidad, expresada como porcentaje, en larvas de pez cebra de 3 dpf tras 24 horas de exposición continua a concentraciones crecientes de aloe-emodina (0.1 a 100 µM). Los datos se expresan como media $\pm$ desviación estándar (DE) ($n = 10$ por grupo), correspondientes a 3 experimentos independientes. El análisis de supervivencia se realizó mediante curvas de Kaplan–Meier y comparación entre grupos utilizando la prueba Log-rank (Mantel–Cox) en GraphPad Prism. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$.

Efecto de Aloe emodina sobre el hígado en larvas hsp70: GFP.

La respuesta de estrés hepático se evaluó mediante la cuantificación de la intensidad de fluorescencia en larvas transgénicas hsp70: GFP de pez cebra (3 dpf), expuestas continuamente a diferentes concentraciones de aloe emodina (AE) (0,1 a 2 μ M). Se incluyeron como controles un grupo sin tratamiento (Control) y un grupo vehículo (DMSO 0,0001%). En la **Figura 5** se presenta la evaluación de la respuesta de estrés en la región hepática de larvas hsp70: GFP expuestas continuamente a AE. Además, los gráficos muestran la cuantificación de la intensidad de fluorescencia hepática mediante unidades arbitrarias (A.U.) tras 24 y 48 horas de exposición, como indicador de activación del transgén hsp70: GFP.

Nuestros resultados muestran que luego de 24 horas de exposición, se observó un aumento de la intensidad de fluorescencia en el hígado de las larvas tratadas con AE respecto de los controles (ver gráfico inferior Figura 5B). Los tratamientos AE 1 μ M y AE 2 μ M presentaron los valores más altos de fluorescencia, con diferencias estadísticamente significativas frente a los demás grupos ($N = 10$; $p < 0,05$; $**p < 0,001$). En cambio, AE 0,1 μ M y AE 0,5 μ M no mostraron incrementos significativos en comparación con control o el grupo tratado con DMSO.

A las 48 horas de exposición continua, se registró una disminución general de la fluorescencia en los grupos tratados, respecto a lo observado a las 24 horas (Figura 5C). En este punto, únicamente AE 2 μ M mantuvo un aumento significativo de fluorescencia frente a los demás tratamientos ($N = 10$; $p < 0,05$), mientras que AE 1 μ M no presentó diferencias significativas en relación con las concentraciones menores ni con los controles. En conjunto, la respuesta fue dependiente de la concentración a las 24 horas (principalmente en 1 y 2 μ M), pero a las 48 horas se mantuvo significativa solo en 2 μ M.



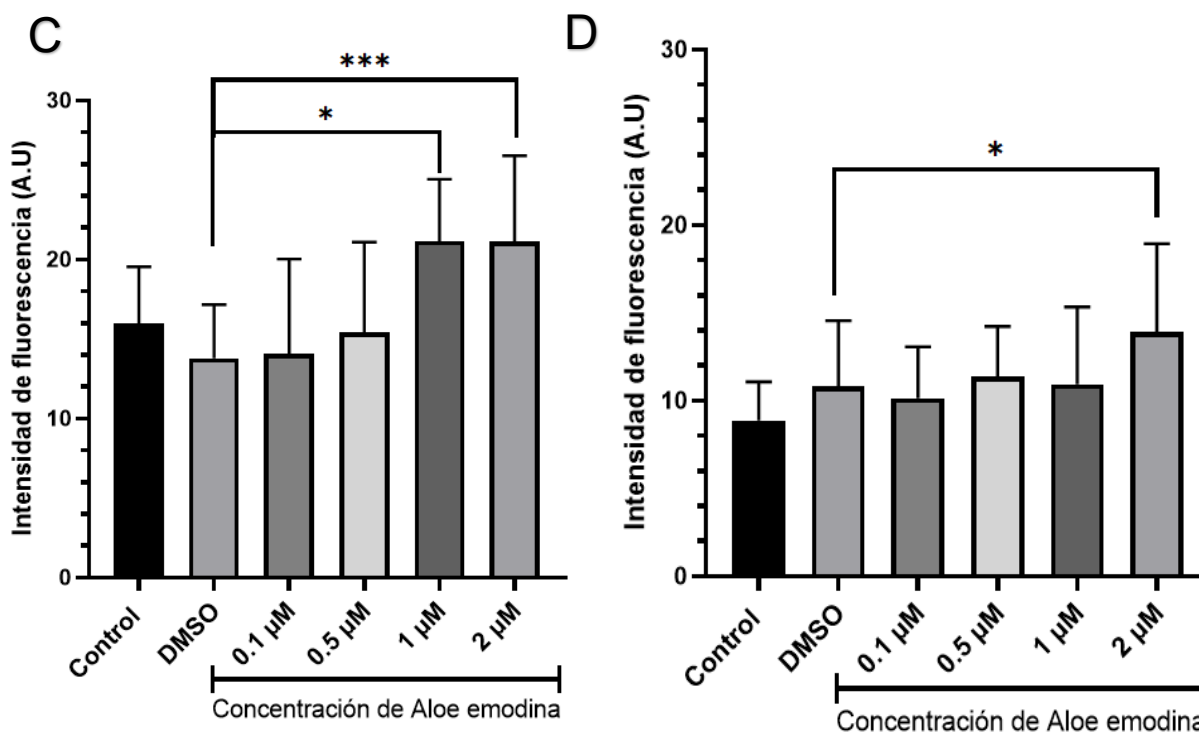
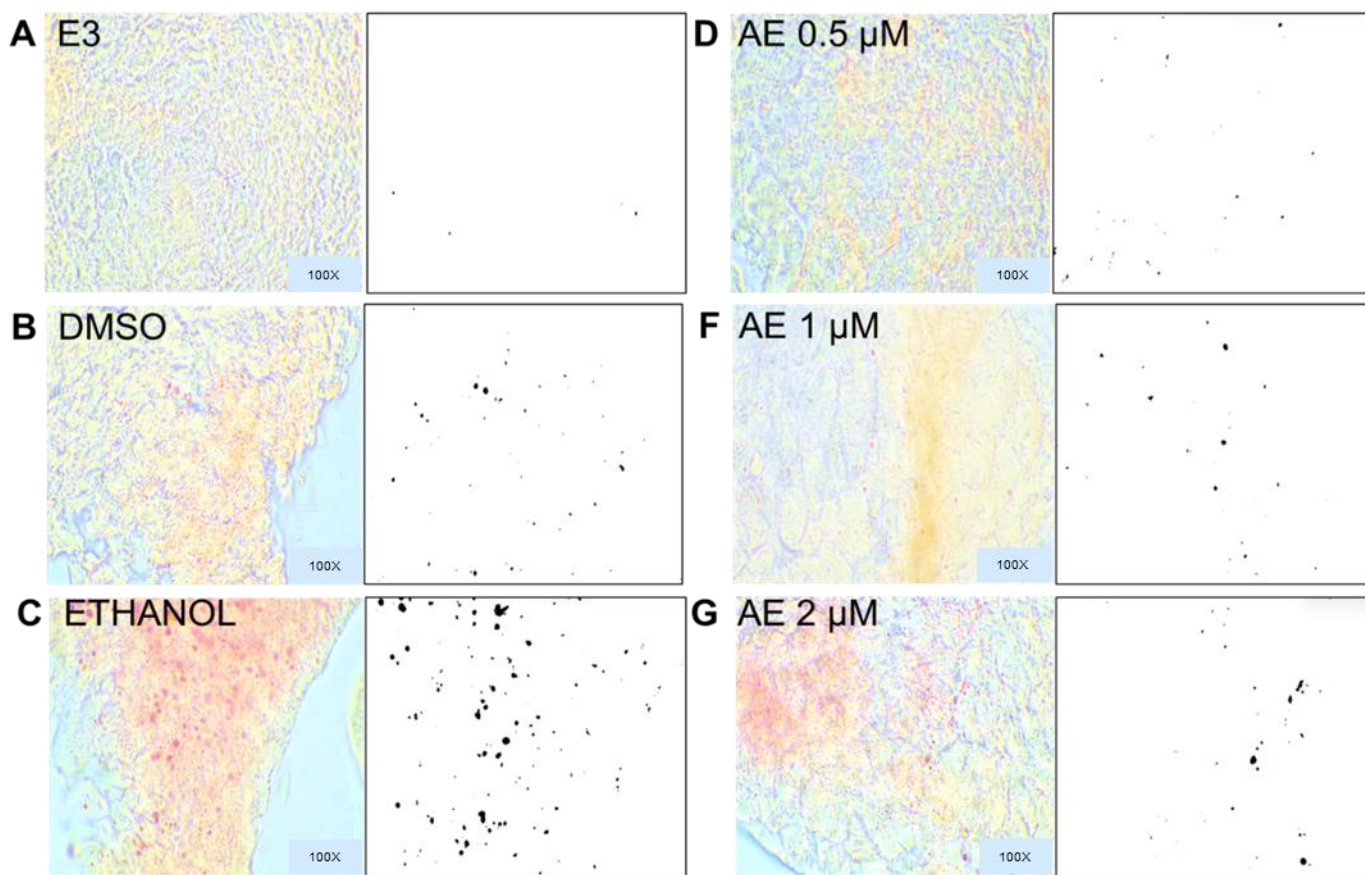


Figura 5: Activación del reportero de hsp70 en hígado de larvas de pez cebra expuestas al Aloe emodina.

Imágenes fluorescentes locales del hígado en larvas de pez cebra incubadas con DMSO a 0.0001 % y Aloe emodina a concentración de 2 μ M durante (A) 24 y (B) 48 horas continuas. Las líneas discontinuas representan el área de análisis representativa del hígado de larva de pez cebra. En (C) y (D) cuantificación de la intensidad de fluorescencia durante 24 horas y 48 horas, respectivamente. AU: ¿Unidades arbitrarias?? (N = 10, * = $p < 0,05$ v/s DMSO, *** = $p < 0,001$ v/s DMSO).

Evaluación de acumulación hepática de lípidos en larvas de pez cebra expuestas a aloe emodina

En la **Figura 6** se presentan microfotografías representativas del hígado de larvas de pez cebra expuestas durante 48 horas a diferentes condiciones experimentales, con el objetivo de visualizar la presencia de depósitos lipídicos hepáticos. En las microfotografías obtenidas se observó que el grupo expuesto a etanol presentó un aumento evidente tanto en el número como en el tamaño de las gotas lipídicas hepáticas en comparación con los grupos control (E3), solvente (DMSO) y los tratamientos con aloe emodina. Por el contrario, las larvas expuestas a AE 0,5 μ M, AE 1 μ M y AE 2 μ M mostraron un patrón de depósitos lipídicos similar al observado en los controles, sin cambios visuales notorios en la distribución o abundancia de gotas de lípido en el hígado (Figura 6).



G

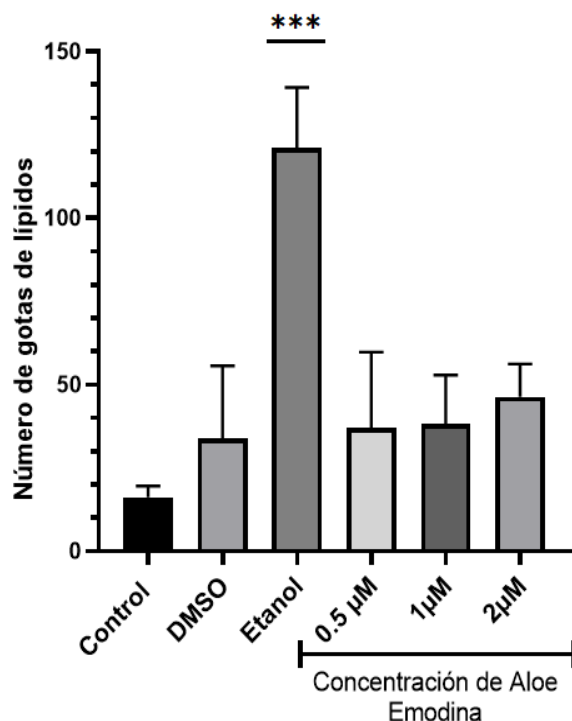


Figura 6 Evaluación de acumulación lipídica hepática en larvas de pez cebra expuestas a aloe emodina.

Larvas de 5 dpf expuestas durante 48 horas) a las siguientes condiciones: (A) medio E3 (control), (B) DMSO (0,0001%), (C) etanol (¿%?), y AE a (D) 0,5 µM, (E) 1 µM y (F) 2 µM. En A hasta F, se muestran microfotografías representativas de la tinción Oil Red O en microscopía de campo claro (izquierda) y la correspondiente imagen binarizada obtenida mediante ImageJ (derecha) para facilitar la identificación de gotas lipídicas en el hígado (puntos negros en imagen binarizada). (G) Cuantificación del número de gotas lipídicas en área aleatoria de hígado visualizada en aumento 100x en los distintos grupos experimentales, representada como media ± DE. El tratamiento con etanol presentó un aumento significativo en el número de gotas lipídicas en comparación con los demás grupos (**p < 0,001), mientras que las concentraciones de aloe emodina no mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al control.

Supervivencia de larvas de pez cebra alimentadas con diferentes dietas.

En la **Figura 7** se muestra el análisis de supervivencia larvaria durante un protocolo de alimentación controlada en pez cebra. Los resultados se presentan como curvas de supervivencia acumulada, expresadas como porcentaje en función de los días de alimentación. Nuestros resultados muestran que, durante los primeros dos días de alimentación, todas las condiciones mantuvieron una supervivencia del 100%, sin eventos de mortalidad registrados. A partir del día 3, se evidenció una disminución progresiva en la supervivencia en los tres grupos, observándose un patrón similar de mortalidad a lo largo del tiempo. Al término de los 10 días de alimentación, los grupos experimentales presentaron valores de supervivencia cercanos a un 50%, sin diferencias evidentes entre las dietas evaluadas. En conjunto, la curva de supervivencia mostró una tendencia comparable entre los tratamientos DC, DC+DE y DC+DE+4%Col, sin observarse un efecto diferencial asociado a la suplementación con colesterol durante el periodo analizado.

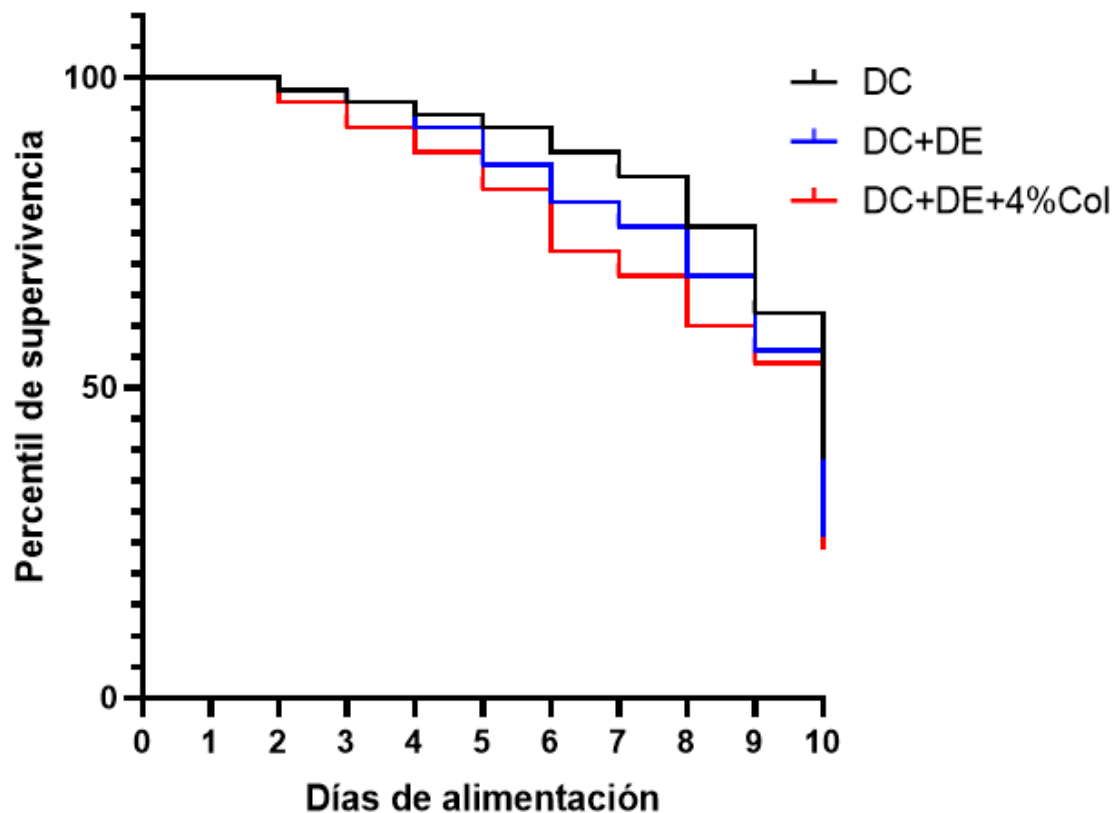


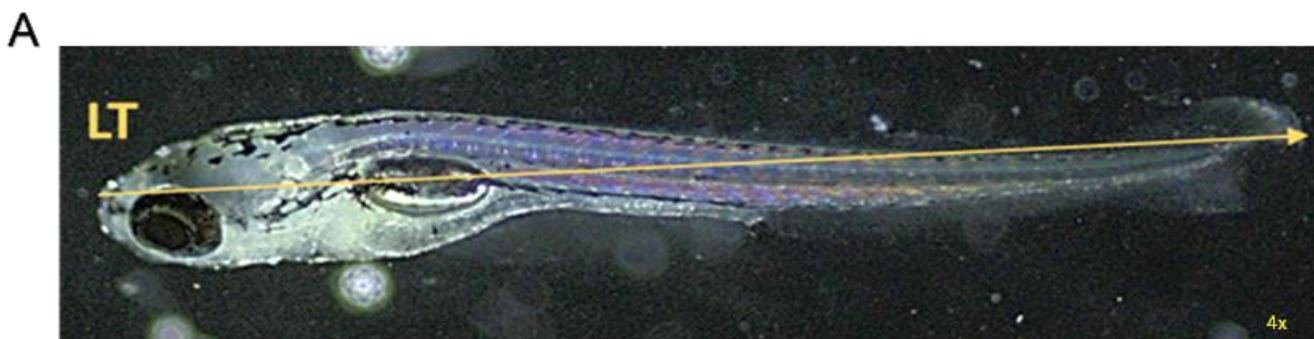
Figura 7:Curvas de supervivencia de larvas de pez cebra alimentadas con diferentes dietas durante 10 días.

Larvas de 5 dpf fueron alimentadas durante 10 días (hasta los 15 dpf) con: dieta control (DC), dieta control más dietil éter (DC+DE) y dieta suplementada con colesterol al 4% (DC+DE+4%Col). La supervivencia fue registrada diariamente y se expresa como porcentaje de supervivencia acumulada en función de los días de alimentación.

Evaluación del tamaño larvario mediante medición de longitud total tras alimentación con dieta suplementada con colesterol.

En la **Figura 8** se presentan las mediciones morfológicas realizadas en larvas de pez cebra luego de un protocolo de alimentación experimental, con el fin de evaluar cambios asociados al crecimiento corporal. La longitud total se determinó a partir de microfotografías de larvas fijadas y montadas en posición lateral, permitiendo cuantificar la distancia desde la boca hasta la cola y comparar el efecto de las distintas dietas sobre el tamaño larvario.

Las mediciones morfológicas evidenciaron un aumento significativo en la longitud total de las larvas alimentadas con la dieta DC+DE+4%Col, en comparación con los grupos DC y DC+DE (Figura 8A–B). Este incremento en LT fue estadísticamente significativo ($p = 0,02$), mientras que no se observaron diferencias relevantes entre los grupos DC y DC+DE. En conjunto, los resultados muestran que la suplementación dietaria con 4% de colesterol se asoció a un aumento en la longitud total en las condiciones evaluadas.



LT: Longitud Larval

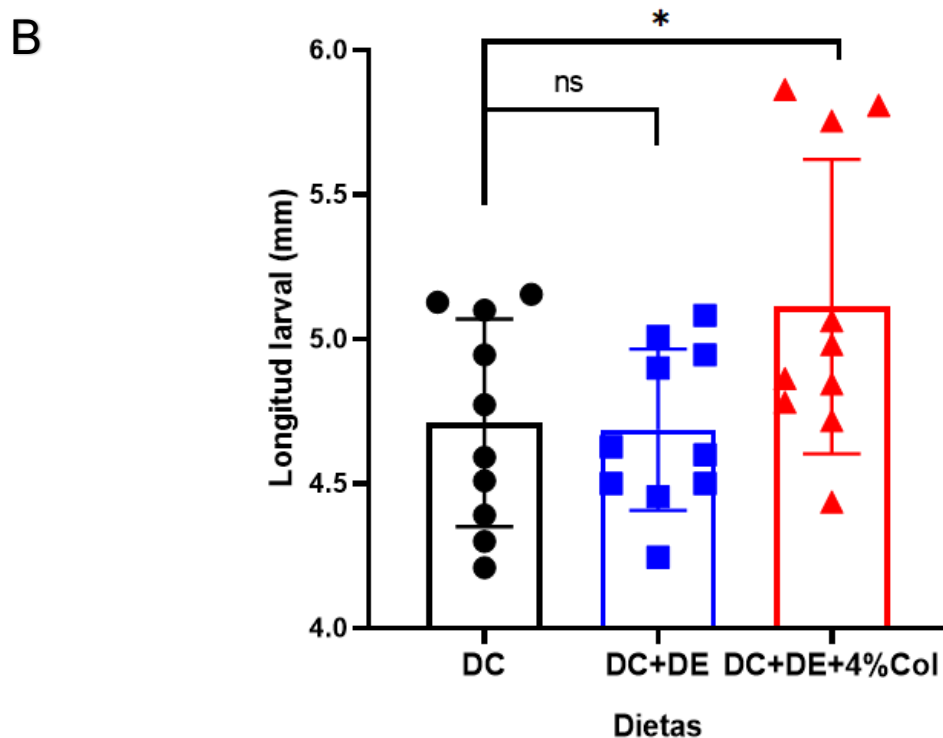


Figura 8: Medición de longitud total en larvas de pez cebra alimentadas con dieta suplementada con colesterol.

Larvas de pez cebra fueron alimentadas durante 10 días con: dieta control (DC), dieta control con dietil éter (DC+DE) y dieta suplementada con colesterol al 4% (DC+DE+4%Col) posteriormente se obtuvieron fotografías de las larvas en posición lateral para determinar la longitud total (LT), medida desde la boca hasta la cola. (A) Microfotografías representativas obtenidas con aumento 4x. (B) Cuantificación de LT en los distintos grupos experimentales. Se observó un aumento significativo de la longitud en el grupo DC+DE+4%Col respecto a los controles ($p = 0,02$).

Parámetros bioquímicos asociados a las diferentes condiciones dietarias

Con el objetivo de evaluar el efecto de las distintas condiciones dietarias sobre el estado metabólico, inflamatorio y hepático de las larvas, se analizaron diversos parámetros bioquímicos. Los resultados globales de estos análisis se presentan de manera comparativa en la **Figura 9**, donde se ilustran los principales parámetros lipídicos, inflamatorios y hepáticos entre los grupos experimentales, mientras que los valores individuales expresados como media $\pm$ desviación estándar se detallan en la **Tabla 3**.

El análisis de los parámetros bioquímicos no evidenció diferencias estadísticamente significativas entre los grupos evaluados. No obstante, se observó una tendencia general al aumento de varios marcadores en las larvas alimentadas con la dieta suplementada con 4% de colesterol, en comparación con los grupos dieta control y dieta control solvente.

En particular, los parámetros lipídicos, como triglicéridos (TG) y colesterol total (TC), mostraron valores más elevados en el grupo DC+DE+4% colesterol, sugiriendo una alteración del metabolismo lipídico asociada a esta condición dietaria. De forma concordante, los marcadores de función y daño hepático, incluyendo aspartato aminotransferasa (AST) y fosfatasa alcalina (ALP), presentaron una tendencia discreta al alza en el grupo con suplementación de colesterol.

Asimismo, se observó un aumento marcado de la proteína C reactiva (CRP) en las larvas alimentadas con la dieta suplementada con colesterol, lo que sugiere la inducción de una respuesta inflamatoria sistémica. Otros parámetros metabólicos, como urea y ácido úrico, mostraron aumento discreto en este grupo, sin embargo, se observó variabilidad entre las muestras.

Por otra parte, albúmina (ALB), bilirrubina total (TBIL), bilirrubina directa (DBIL), creatinina (Cr) y calcio (Ca) se encontraron por debajo del límite de detección en todos los grupos experimentales. En conjunto, estos resultados indican que, si bien las diferencias observadas no alcanzaron significancia estadística, la dieta suplementada con 4% de colesterol induce una tendencia consistente hacia un perfil bioquímico

compatible con alteraciones lipídicas, inflamatorias y hepáticas, siendo más evidente en los niveles de CRP, AST, colesterol total y triglicéridos.

Tabla 3 :Parámetros bioquímicos en larvas de pez cebra alimentadas con diferentes condiciones dietarias.

PARÁMETRO (mg/dL)	Dieta Control $\bar{x} \pm SD$	Dieta Control solvente $\bar{x} \pm SD$	Dieta 4% de Colesterol $\bar{x} \pm SD$
Triglicéridos (TG)	4,0 ± 1,1	18,9 ± 14,7	18,6 ± 14,8
Colesterol total (TC)	2,8 ± 3,1	4,6 ± 4,6	7,9 ± 6,7
Lipoproteínas de alta densidad (HDL)	89,5 ± 28,8	308,5 ± 417,6	63,5 ± 70,8
Alanina aminotransferasa (ALT)	7,7 ± 2,9	28,2 ± 37,3	23,5 ± 22,4
Aspartato aminotransferasa (AST)	63,0 ± 65	99,5 ± 102,5	159 ± 135
Tiempo de protrombina (TP)	0,13 ± 0,1	0,23 ± 0,2	0,19 ± 0,2
Albúmina (ALB)	Indetectable		
Bilirrubina (TBIL)	Indetectable		
Bilirubina directa (DBIL)	Indetectable		
Gamma-glutamil transferasa (GGT)	1,0 ± 0,8	10,7 ± 5,4	9,2 ± 9,1
Fosfatasa alcalina (ALP)	41,7 ± 20,8	114,5 ± 197,7	173,2 ± 194,7
UREA	2,1 ± 1,1	4,9 ± 5,2	85,4 ± 214,1
Creatinina (Cr)	Indetectable		
UA	0,2 ± 0,08	0,25 ± 0,1	0,34 ± 0,1
Lactato deshidrogenasa (LDH)	89,5 ± 28,8	63,5 ± 70,8	308,5 ± 417,6
Fosforo (P)	17,3 ± 2,3	20,0 ± 8,4	22,6 ± 10,5
Calcio (Ca)	Indetectable		
Proteína C reactiva (CRP)	0,2 ± 0,2	0,83 ± 0,7	1,2 ± 0,2
Glucosa (GLU)	0,9 ± 0,7	1,03 ± 0,4	0,96 ± 0,7

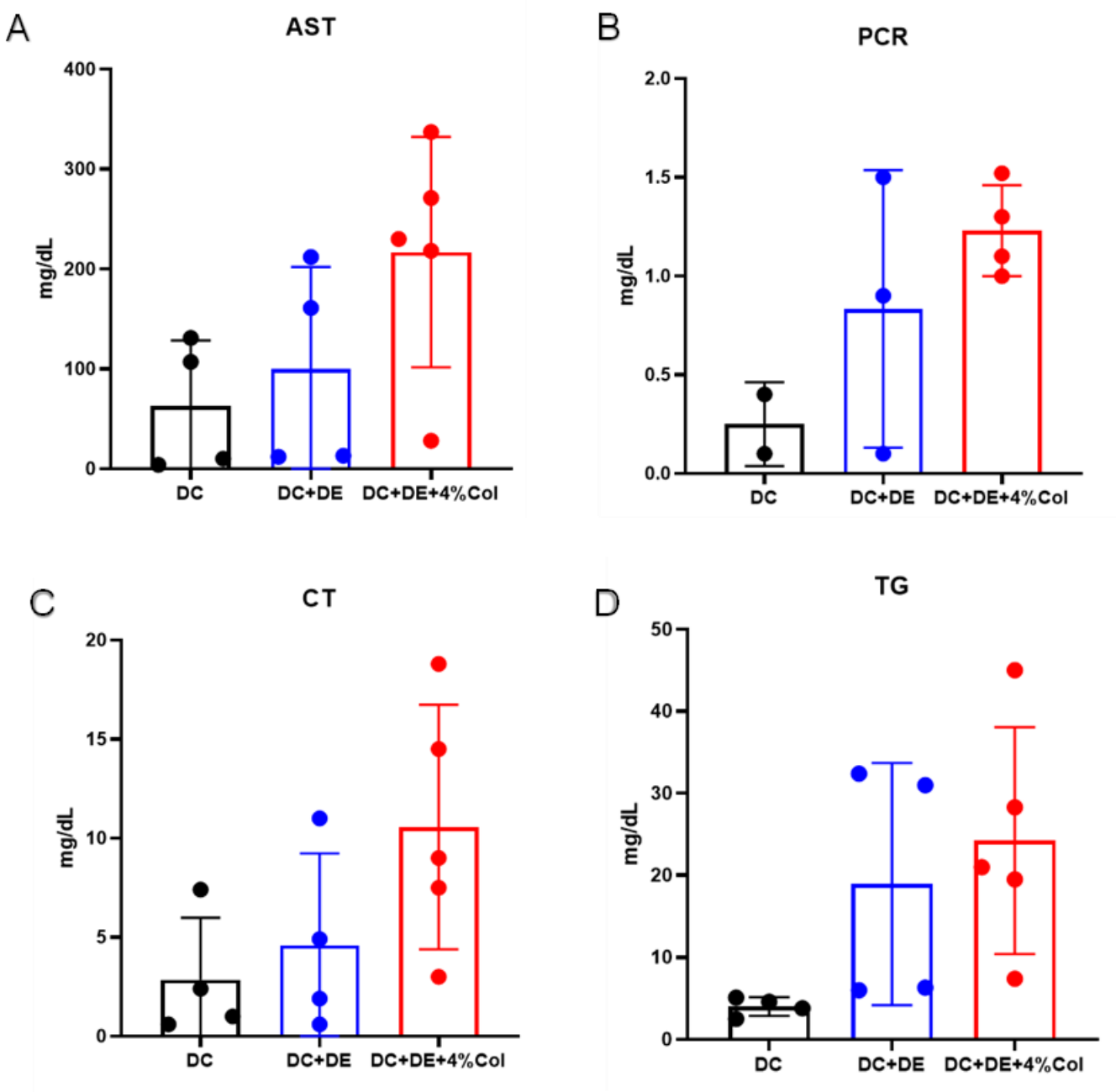


Figura 8 :Parámetros bioquímicos en larvas de Danio rerio alimentadas con diferentes condiciones dietarias.

Las larvas fueron distribuidas en tres grupos experimentales: DC, DC+DE y DC+DE+4% Col. (A) Actividad AST, (B) concentración de PCR, (C) CT y (D) TG. Todos los parámetros se expresan en mg/dL. Los gráficos muestran los valores individuales junto con la media $\pm$ desviación estándar. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía y Kruskal-Wallis. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales ($p > 0,05$).

Identificación de granulocitos en la vena cardinal de larvas alimentadas con dieta suplementada con colesterol

En la **Figura 9** se presenta la identificación morfológica y cuantificación de granulocitos en la región de la vena cardinal de larvas de pez cebra. Las imágenes representativas muestran células granulocíticas localizadas en el área vascular delimitada por vasos intersegmentales, caracterizadas por la presencia de múltiples gránulos citoplasmáticos con distinta intensidad de tinción y morfología nuclear lobulada. El análisis cuantitativo evidenció que las larvas alimentadas con dieta alta en colesterol presentaron un aumento significativo en el número de granulocitos respecto al grupo control. En particular, el grupo alimentado con dieta suplementada con 4% de colesterol (DC+DE+4%Col) mostró un recuento mayor de granulocitos en comparación con la dieta control (DC), observándose una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,0001$). En contraste, no se observaron diferencias en el número de granulocitos al comparar los grupos control y control de solvente, lo que indica valores similares entre DC y DC+DE bajo las condiciones evaluadas.

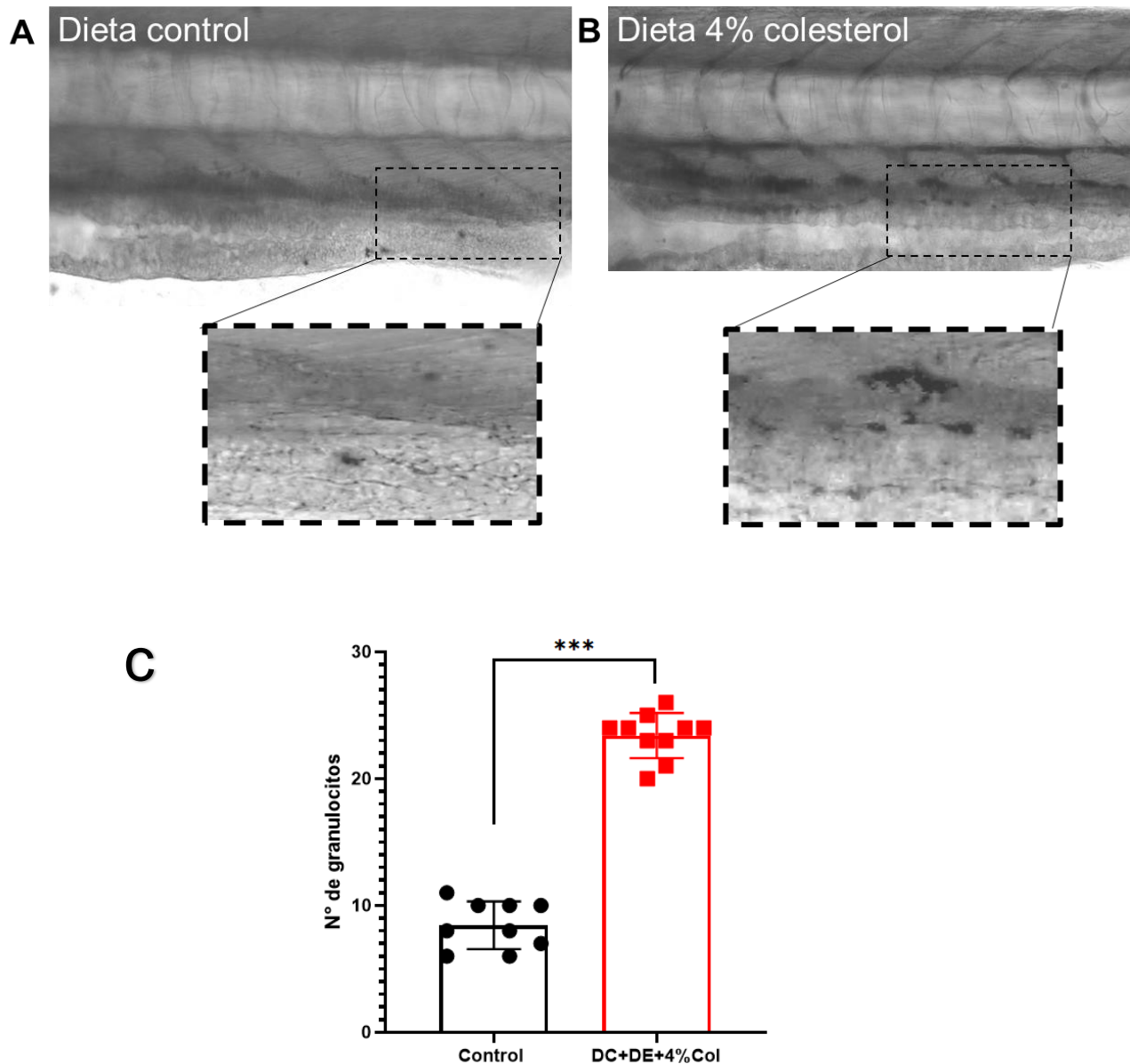


Figura 9 Cuantificación de granulocitos en la región de la vena cardinal en larvas de pez cebra alimentadas con dieta suplementada con colesterol.

(A–B) Microfotografías representativas de la vena cardinal en la región del tronco, donde se observan granulocitos entre los vasos intersegmentales. (C) Recuento de granulocitos cuantificados por microscopía en un área definida (20×–40×) en los distintos tratamientos dietarios. El grupo alimentado con dieta suplementada con colesterol (DC+DE+4%Col) presentó un aumento significativo en el número de granulocitos respecto al grupo control (** $p < 0,0001$).

Depósitos lipídicos y alteraciones morfométricas del sistema vascular en larvas de pez cebra alimentadas con diferentes condiciones dietarias.

La evaluación del sistema vascular de larvas de pez cebra alimentadas con diferentes condiciones dietarias permitió identificar cambios visibles en la señal asociada a depósitos lipídicos y modificaciones en parámetros morfométricos vasculares. Mediante tinción con Sudan Black, se observaron diferencias evidentes en la distribución e intensidad de la señal lipídica entre larvas alimentadas con dieta control (DC), dieta control con solvente (DC+DE) y dieta suplementada con 4% de colesterol (DC+DE+4%Col) (**Figura 10**). En particular, las larvas alimentadas con la dieta suplementada con colesterol presentaron una señal más intensa y extendida a lo largo de la vasculatura en comparación con los grupos control, lo que evidencia una mayor presencia visual de depósitos lipídicos bajo esta condición dietaria.

Con el fin de respaldar cuantitativamente estas observaciones, se realizó un análisis morfométrico del sistema vascular evaluando área total del vaso, diámetro, largo y ancho de tronco (**Figura 11**). La cuantificación de estos parámetros mostró que la dieta suplementada con 4% de colesterol (DC+DE+4%Col) presentó un aumento significativo en el área del vaso ($**p < 0,01$), diámetro del vaso ($**p < 0,01$ y $***p < 0,001$) y largo del vaso ($***p < 0,001$) en comparación con los grupos control. En contraste, el ancho del tronco no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y control solvente (ns) versus la dieta suplementada con 4% de colesterol. En conjunto, estos resultados indican que la dieta suplementada con colesterol se asoció a modificaciones estructurales específicas del sistema vascular, reflejadas en cambios morfométricos consistentes en varios de los parámetros evaluados.

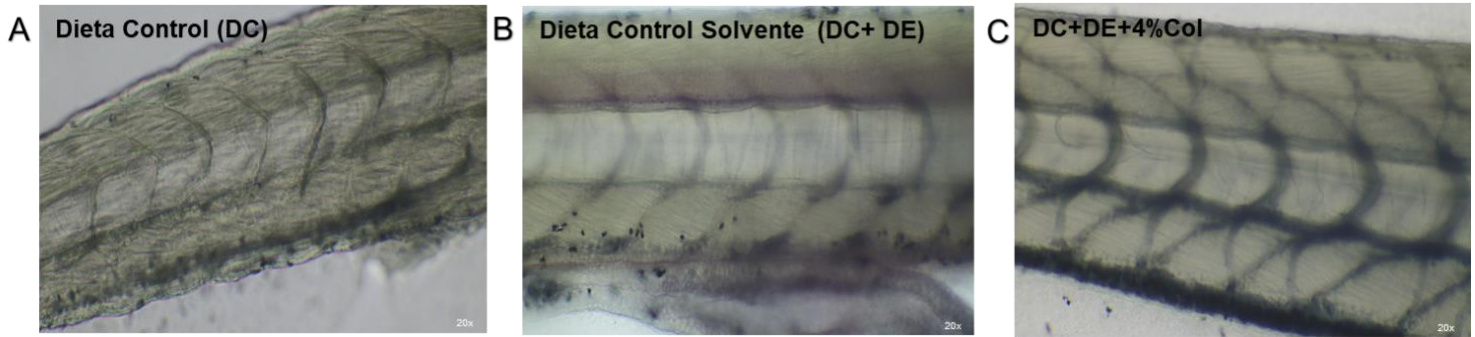
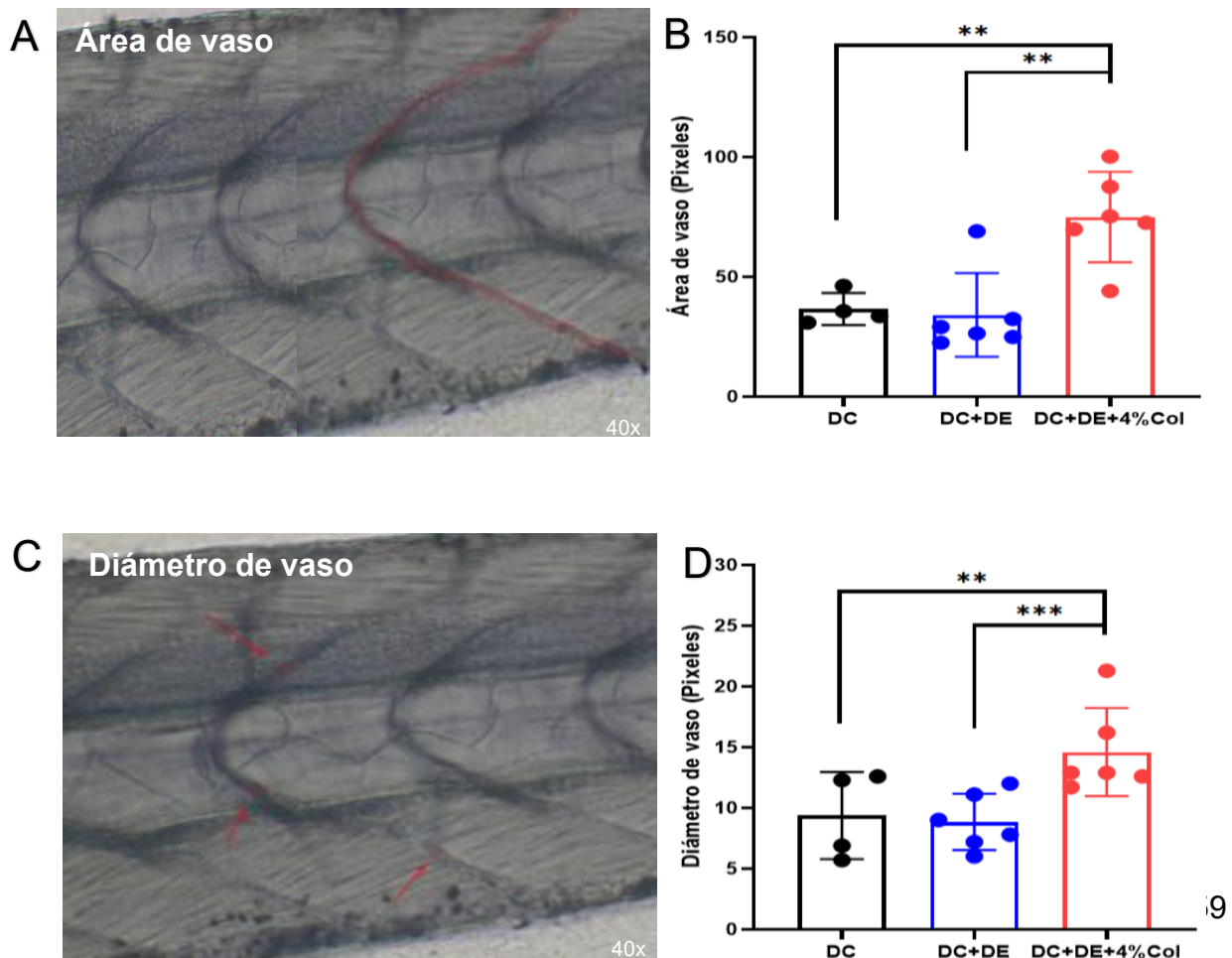


Figura 10: Imágenes representativas de la tinción con Sudan Black en el sistema vascular de larvas de pez cebra alimentadas con diferentes condiciones dietarias.

Se muestran microfotografías correspondientes a larvas alimentadas con (A) dieta control (DC), (B) dieta control con solvente (DC+DE) y (C) dieta suplementada con 4% de colesterol (DC+DE+4%Col). Las imágenes ilustran de manera cualitativa las diferencias de distribución e intensidad de la señal asociada a depósitos lipídicos entre las distintas condiciones dietarias.



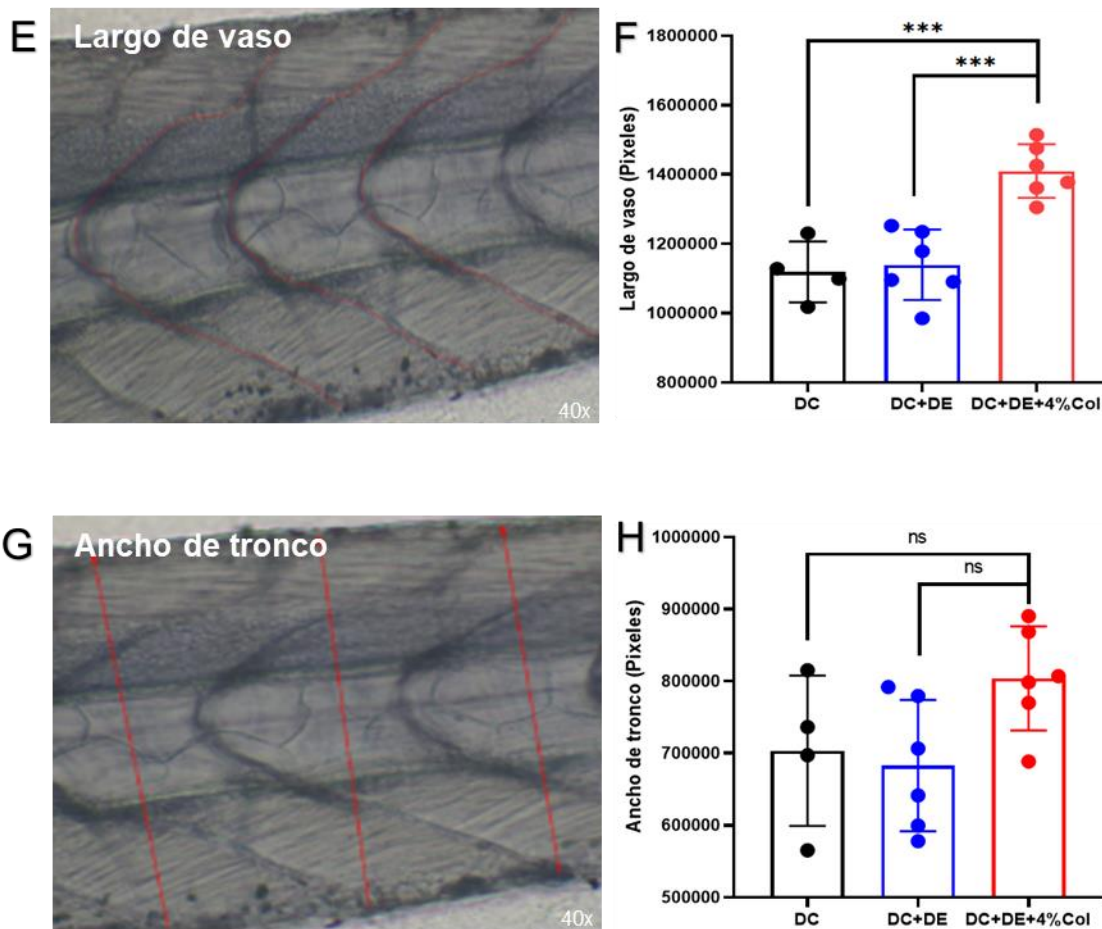


Figura 11: Análisis morfométrico del sistema vascular en larvas de pez cebra alimentadas con diferentes condiciones dietarias.

Se presentan imágenes representativas de la medición de (A) área del vaso, (C) diámetro, (E) largo y (G) ancho, junto con la cuantificación correspondiente de cada parámetro (B, D, F y H, respectivamente). Los valores se expresan en píxeles y se presentan como media $\pm$ DE. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA una vía.

Supervivencia larvaria durante la administración de aloe emodina en un modelo de dieta suplementada con colesterol

En la **Figura 12** se presenta el análisis de supervivencia larvaria durante un protocolo de alimentación experimental en pez cebra y la administración complementaria de aloe emodina. Los resultados se expresan como porcentaje de supervivencia acumulada en función de los días, permitiendo comparar el comportamiento de larvas alimentadas con dieta control, dieta suplementada con colesterol y dieta suplementada con colesterol combinada con tratamiento diario de aloe emodina.

Durante los primeros dos días de seguimiento no se registraron muertes en ninguno de los grupos experimentales. A partir del día 3, se observó una disminución progresiva en la supervivencia, con un patrón similar entre las condiciones evaluadas. Al finalizar el periodo experimental, la supervivencia acumulada se aproximó a un valor cercano al 50% en los tres grupos. La comparación de las curvas de supervivencia no evidenció diferencias relevantes entre el grupo alimentado con dieta control y los grupos alimentados con dieta suplementada con colesterol, ni tampoco entre la dieta con colesterol sola y la dieta con colesterol combinada con la administración diaria de aloe emodina. En conjunto, los resultados muestran que la administración de aloe emodina 1 μM bajo este esquema no se asoció a variaciones evidentes en la supervivencia larvaria durante el periodo evaluado, y que la suplementación con colesterol genera una tendencia a reducir la supervivencia de las larvas.

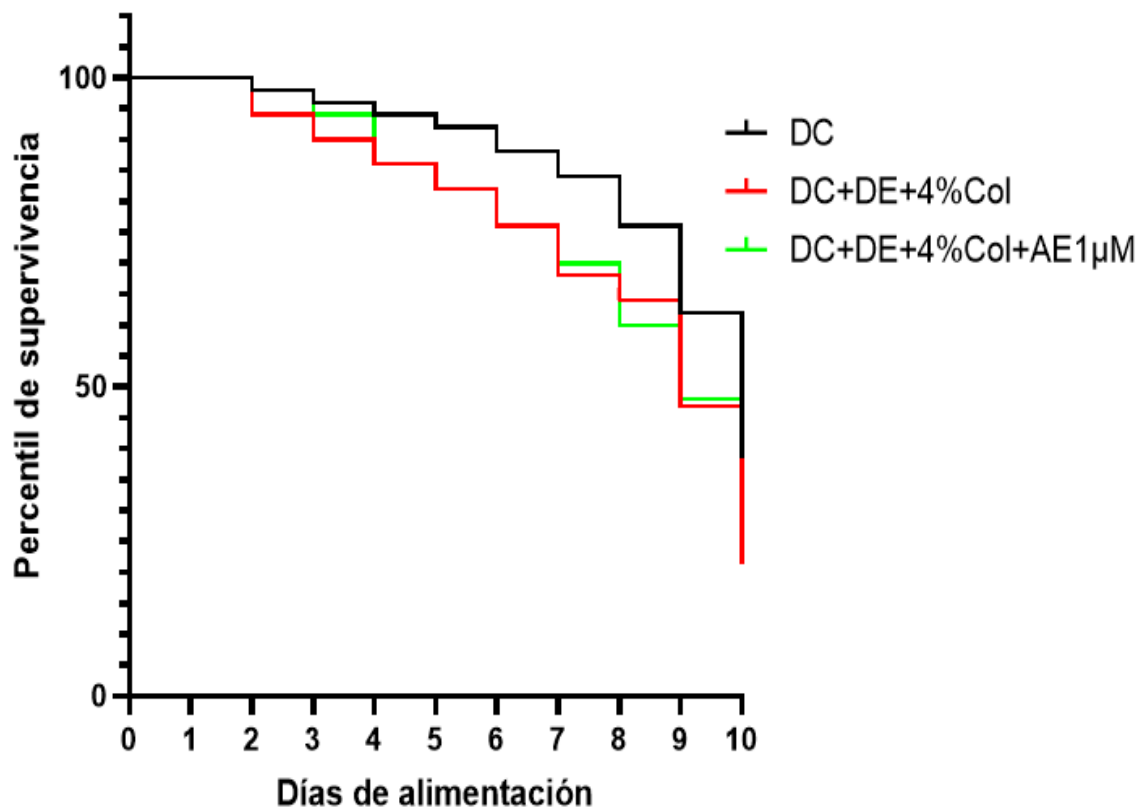


Figura 12. Curvas de supervivencia de larvas de pez cebra alimentadas con dieta suplementada con colesterol y tratadas con aloe emodina.

Larvas de 5 dpf fueron alimentadas durante 10 días con dieta control (DC), dieta suplementada con 4% de colesterol (DC+DE+4%Col) y dieta suplementada con 4% de colesterol + aloe emodina 1 µM. El Aloe emodina fue administrada mediante inmersión durante 1 hora diaria a lo largo del periodo experimental. La supervivencia fue registrada diariamente y se expresa como porcentaje de supervivencia acumulada en función del tiempo.

Efecto Aloe emodina sobre la longitud larvaria en un modelo de dieta suplementada con colesterol

Con el fin de evaluar cambios morfológicos asociados al crecimiento larvario bajo condiciones de dieta suplementada con colesterol y tratamiento con aloe emodina, se midió la longitud total larvaria (LT) en larvas de pez cebra sometidas a un protocolo de alimentación durante 10 días. En la **Figura 13** se presenta la medición de la longitud total larvaria como parámetro morfológico de crecimiento en larvas de pez cebra sometidas a diferentes condiciones dietarias y tratamiento con aloe emodina

El análisis de la longitud larvaria evidenció diferencias significativas entre los grupos evaluados (Figura 13). Las larvas alimentadas con dieta suplementada con 4% de colesterol DC+DE+4%Col presentaron un aumento significativo de LT en comparación con el grupo DC ($p < 0,05$). Adicionalmente, las larvas alimentadas con DC+DE+4%Co y tratadas con aloe emodina 1 μ M mostraron una reducción significativa en la longitud total en comparación con las larvas alimentadas con DC+DE+4%Col sin tratamiento ($p < 0,05$). En conjunto, los resultados indican que la dieta suplementada con colesterol se asoció a un incremento en la longitud larvaria, mientras que la administración de AE se relacionó con una disminución significativa de este parámetro morfológico, acercando los valores a los niveles control de las larvas alimentadas con la dieta no hipercolesterolémica.

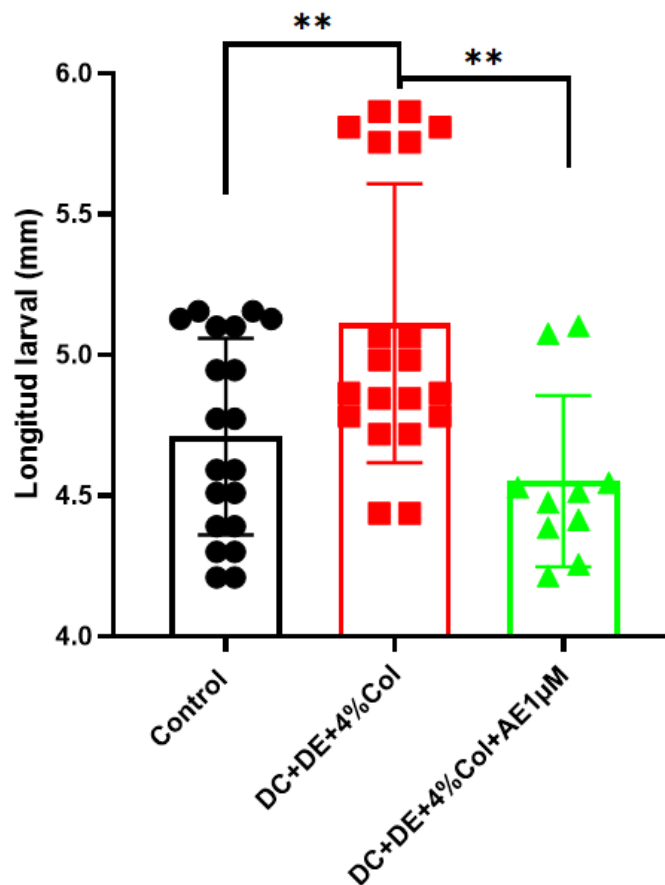


Figura 13: Medición de longitud total en larvas de pez cebra alimentadas con dieta suplementada con colesterol y tratadas con aloe emodina

Los resultados se presentan como valores individuales y media $\pm$ DE. Se observó un aumento significativo de la LT en el grupo DC+DE+4%col en comparación con control solvente, y una disminución significativa de la LT en el DC+DE+4%col+AE 1 μ M respecto al grupo HCD (** $p < 0,05$). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía.

Parámetros bioquímicos en larvas sometidas a dieta hipercolesterolémica y tratamiento con Aloe emodina

Con el fin de evaluar el impacto de la suplementación con colesterol y el efecto del tratamiento con Aloe emodina sobre el perfil bioquímico de las larvas, se analizaron diversos parámetros metabólicos, inflamatorios y hepáticos. La **Figura 14** presenta una comparación gráfica de los principales parámetros bioquímicos entre los grupos experimentales, permitiendo visualizar las tendencias generales asociadas a cada condición dietaria, mientras que los valores cuantitativos se detallan en la **Tabla 4**.

Al evaluar el efecto del tratamiento con Aloe emodina (0.5 μ M) en larvas alimentadas con la dieta suplementada con 4% de colesterol, se observó una disminución en la tendencia al aumento previamente descrita para varios de los parámetros analizados. En particular, los niveles de TG, TC, AST, ALT, GGT, ALP y CRP mostraron valores inferiores en el grupo tratado con Aloe emodina en comparación con el grupo que recibió únicamente la dieta rica en colesterol, evidenciando una tendencia hacia la normalización de estos marcadores.

Otros parámetros metabólicos, como urea y ácido úrico, también presentaron una reducción en el grupo tratado con Aloe emodina, aunque con una elevada variabilidad entre las muestras. Por otra parte, albúmina, bilirrubina total, bilirrubina directa, creatinina y calcio se mantuvieron por debajo del límite de detección en todos los grupos experimentales.

En conjunto, estos resultados indican que, si bien las diferencias observadas no alcanzaron significancia estadística, la dieta suplementada con 4% de colesterol induce una tendencia hacia alteraciones lipídicas, inflamatorias y hepáticas, mientras que el tratamiento con Aloe emodina atenúa dichas alteraciones, sugiriendo un posible efecto modulador sobre los cambios bioquímicos inducidos por la dieta hipercolesterolémica.

Tabla 4: Parámetros bioquímicos en larvas de pez cebra alimentadas con dieta suplementada con 4% de colesterol y expuestas al tratamiento de Aloe emodina.

PARÁMETRO (mg/dL)	Dieta Control $\bar{x} \pm SD$	Dieta 4% de Colesterol $\bar{x} \pm SD$	Dieta 4% de Colesterol +Aloe Emodina $\bar{x} \pm SD$
Triglicéridos (TG)	4,0 ± 1,1	18,6 ± 14,8	11,5 ± 6,5
Colesterol total (TC)	2,8 ± 3,1	7,9 ± 6,7	6,0 ± 6,7
Lipoproteínas de alta densidad (HDL)	89,5 ± 28,8	63,5 ± 70,8	3,9 ± 1,4
Alanina aminotransferasa (ALT)	7,7 ± 2,9	23,5 ± 22,4	13,75 ± 7,3
Aspartato aminotransferasa (AST)	63,0 ± 65	159 ± 135	83,50 ± 83
Tiempo de protrombina (TP)	0,13 ± 0,1	0,19 ± 0,2	0,15 ± 0,1
Albúmina (ALB)	Indetectable		
Bilirrubina (TBIL)	Indetectable		
Bilirrubina directa (DBIL)	Indetectable		
Gamma-glutamil transferasa (GGT)	1,0 ± 0,8	9,2 ± 9,1	5,50 ± 4,8
Fosfatasa alcalina (ALP)	41,7 ± 20,8	173,2 ± 194,7	98,00 ± 93
UREA	2,1 ± 1,1	85,4 ± 214,1	4,49 ± 4,7
CREA	Indetectable		
UA	0,2 ± 0,08	0,34 ± 0,1	0,26 ± 0,06
Lactato deshidrogenasa (LDH)	89,5 ± 28,8	63,5 ± 70,8	65,7 ± 51,7
Fosforo (P)	17,3 ± 2,3	22,6 ± 10,5	24,8 ± 12,9
Calcio (Ca)	Indetectable		
Proteína C reactiva (CRP)	0,2 ± 0,2	1,2 ± 0,2	0,75 ± 0,3
Glucosa (GLU)	0,9 ± 0,7	0,96 ± 0,7	1,25 ± 0,3

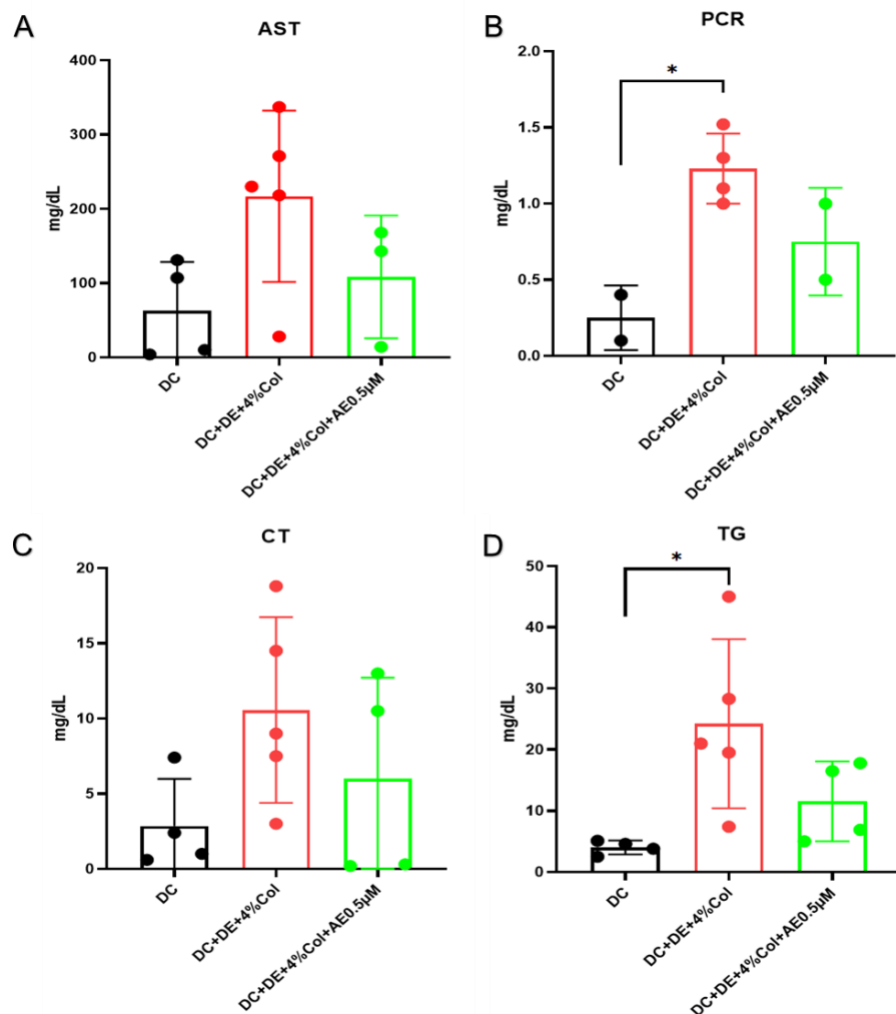
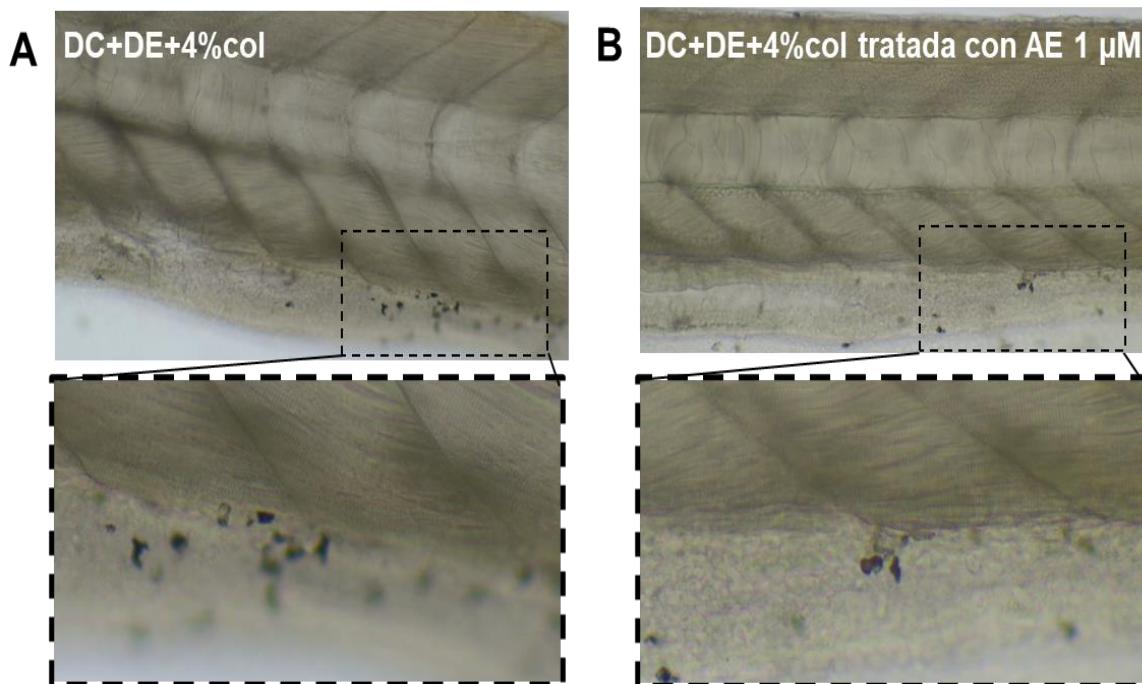


Figura 14 :Parámetros bioquímicos en larvas de Danio rerio alimentadas con dieta suplementada con 4% de colesterol y tratadas con aloe emodina.

Las larvas se distribuyeron en los siguientes grupos experimentales: dieta control (DC), dieta suplementada con 4% de colesterol (DC+DE+4% Col) y dieta suplementada con 4% de colesterol tratada con aloe emodina a 0,5 μ M (DC+DE+4% Col+ AE 0,5 μ M). Se evaluó (A) aspartato aminotransferasa (AST), (B) proteína C reactiva (PCR), (C) colesterol total (CT) y (D) triglicéridos (TG). Los valores se expresan en mg/dL y se presentan como valores individuales con su respectiva media $\pm$ desviación estándar. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía y Kruskal-Wallis (* $p < 0,05$).

Efecto del tratamiento con aloe emodina sobre el número de granulocitos perivasculares en larvas alimentadas con dieta suplementada con colesterol

En la **Figura 15** se presenta la identificación y cuantificación de granulocitos localizados en la región de la vena cardinal de larvas de pez cebra. El análisis cuantitativo evidenció un aumento significativo en el número de granulocitos en las larvas alimentadas con dieta suplementada con 4% de colesterol (DC+DE+4%Col) en comparación con el grupo alimentado con dieta control, registrándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$). Adicionalmente, las larvas alimentadas con DC+DE+4%Col y tratadas con aloe emodina 1 μM presentaron una disminución significativa en el número de granulocitos respecto al grupo alimentado con DC+DE+4%Col sin tratamiento ($p < 0,05$). Los resultados muestran que el incremento de granulocitos asociado a la dieta suplementada con colesterol se redujo significativamente tras la administración de aloe emodina bajo las condiciones evaluadas.



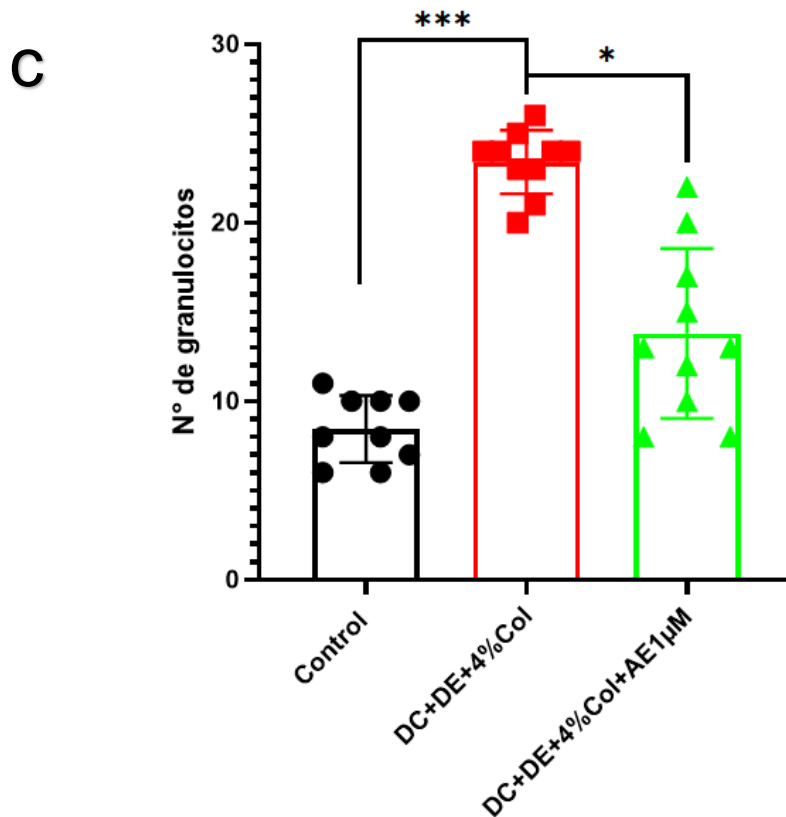


Figura 15: Cuantificación de granulocitos en la región de la vena cardinal en larvas de pez cebra alimentadas con dieta suplementada con colesterol y tratadas con Aloe emodina.

Se analizaron 20 larvas por grupo, las cuales fueron fijadas en formalina y teñidas con Sudan Black B (SBB). (A–B) Microfotografías representativas de la región de la vena cardinal, donde se observan granulocitos delimitados por vasos intersegmentales; se incluyen ampliaciones del área señalada. (C) Recuento de granulocitos cuantificados por microscopía (20× y 40×).

Depósitos lipídicos en el sistema vascular de larvas de pez cebra alimentadas con dieta suplementada con colesterol y tratadas con aloe emodina.

La evaluación del sistema vascular mediante tinción con Sudan Black permitió visualizar diferencias en la señal asociada a presencia de lípidos neutros en la región vascular entre las larvas alimentadas con dieta suplementada con 4% de colesterol y aquellas sometidas al mismo régimen dietario con tratamiento adicional de aloe emodina 0,5 μM (**Figura 16**). En las larvas no tratadas, la señal se observó intensa y ampliamente distribuida a lo largo de la vasculatura, mientras que larvas tratadas con aloe emodina presentaron una señal atenuada. Estas imágenes representativas evidencian variaciones en la distribución de los depósitos lipídicos entre ambas condiciones experimentales.

En concordancia con estas observaciones, se realizó un análisis morfométrico del sistema vascular para evaluar cambios estructurales asociados a las condiciones experimentales (**Figura 17**). La cuantificación de área total, diámetro, largo y ancho de vasos representativos mostró diferencias estadísticamente significativas en todos los parámetros evaluados, observándose valores menores en las larvas tratadas con aloe emodina 0,5 μM en comparación con las larvas alimentadas únicamente con dieta suplementada con colesterol. En conjunto, los resultados evidencian una reducción consistente de los parámetros morfométricos vasculares en las larvas tratadas bajo las condiciones evaluadas.

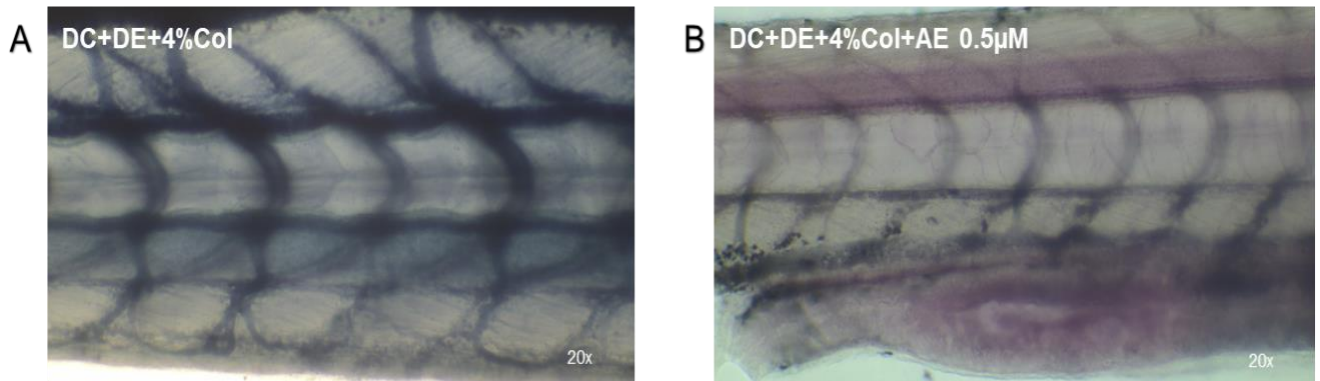


Figura 16 Imágenes representativas de la tinción con Sudan Black en el sistema vascular de larvas de pez cebra alimentadas con dieta suplementada con colesterol.

A la izquierda se observa la señal asociada a depósitos lipídicos en larvas no tratadas, mientras que a la derecha se muestra la señal correspondiente a larvas tratadas con aloe emodina 0,5 μM . Las imágenes ilustran de manera cualitativa diferencias en la distribución e intensidad de los depósitos lipídicos entre ambas condiciones.

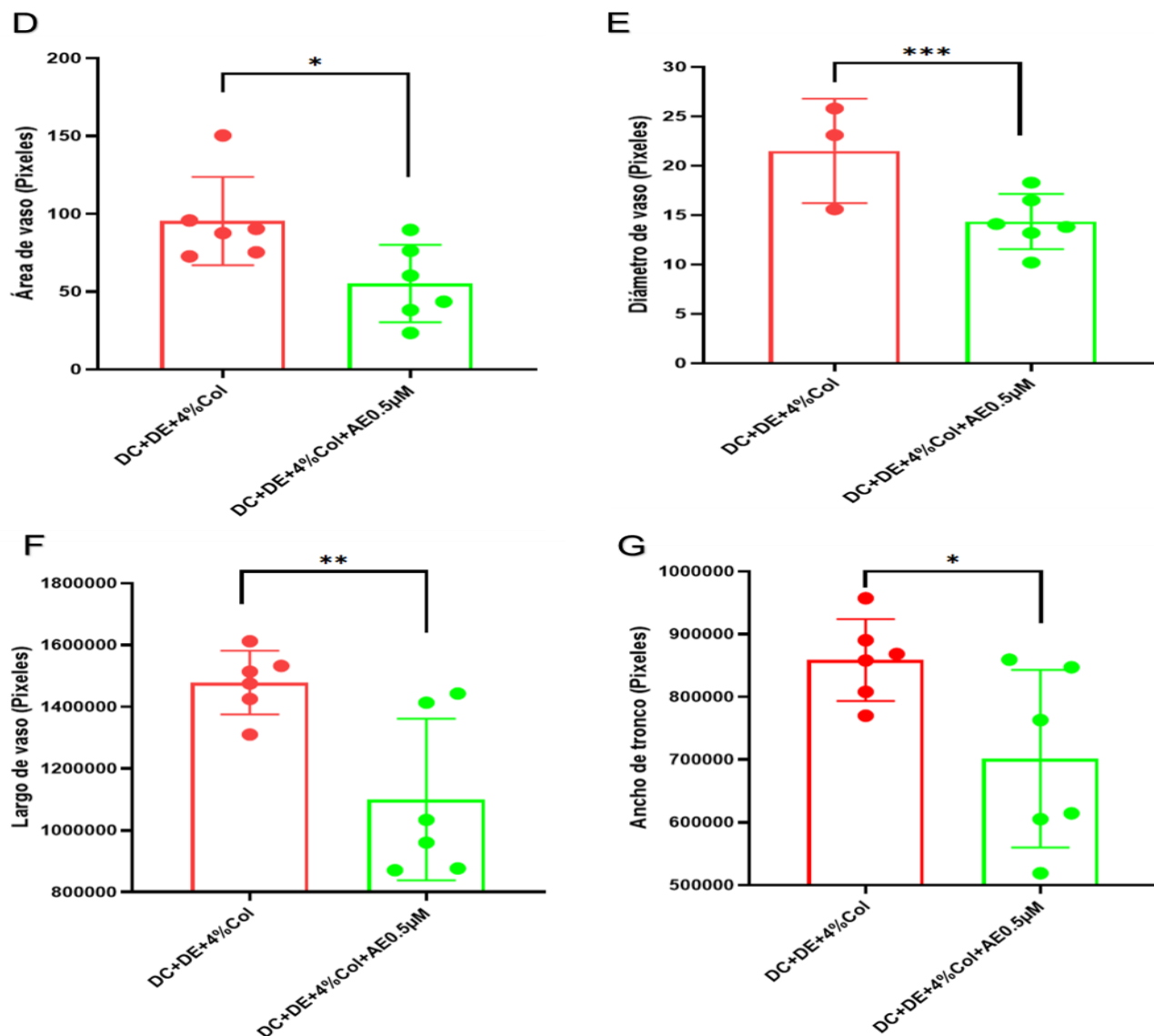


Figura 17: Análisis morfométrico del sistema vascular en larvas de pez cebra alimentadas con dieta suplementada con colesterol y tratadas con aloe emodina.

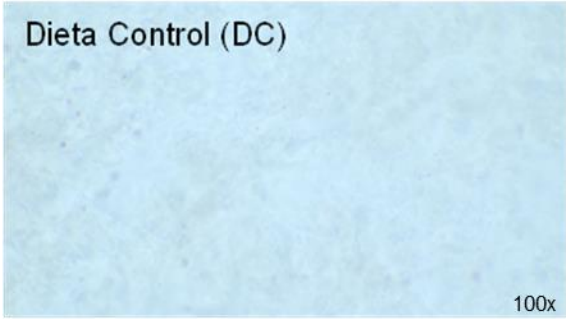
Se presentan los valores correspondientes a (A) área total del vaso, (B) diámetro, (C) largo y (D) ancho de vasos representativos en larvas alimentadas con dieta suplementada con 4% de colesterol (DC+DE+4%Col) y larvas alimentadas con la misma dieta y tratadas con Aloe emodina 0,5 µM. Los parámetros fueron cuantificados en tres vasos por larva, considerando un n = 6 por grupo, y expresados en píxeles. Los datos se presentan como media ± DE. ANOVA de 1 vía (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Depósitos lipídicos hepáticos en larvas de pez cebra alimentadas con dieta suplementada con colesterol y tratadas con aloe emodina

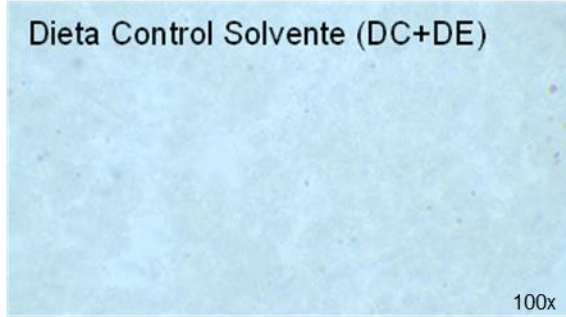
La **Figura 18** muestra imágenes representativas del hígado disecado y el análisis cuantitativo del recuento de gotas lipídicas en larvas sometidas a dietas control, dieta suplementada con colesterol y dieta suplementada con colesterol combinada con tratamiento con aloe emodina. La cuantificación de depósitos lipídicos hepáticos evidenció diferencias marcadas entre las condiciones dietarias evaluadas (Figura 18). En comparación con los grupos alimentados con dietas control las larvas alimentadas con dieta alta en colesterol presentaron un incremento de gotas lipídicas evidente en las microfotografías, y significativo ($**p < 0,001$) en el análisis de imagenológico (4 veces) (Figura 18A–C).

Al evaluar el efecto del tratamiento con aloe emodina en el contexto de la dieta suplementada con colesterol, se comprobó nuevamente que la dieta suplementada con colesterol incrementó significativamente los depósitos lipídicos respecto a los controles ($**p < 0,001$), y se observó que la administración de AE 0,5 y 1 μM redujo significativamente la presencia de gotas lipídicas en comparación en dicho grupo (Figura 18D-E; $p < 0,05$).

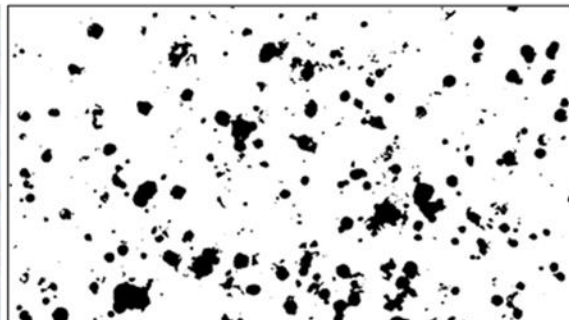
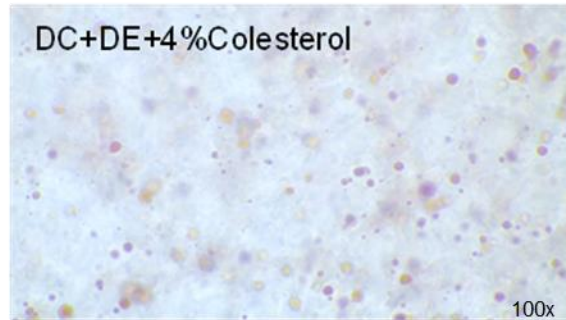
A Dieta Control (DC)



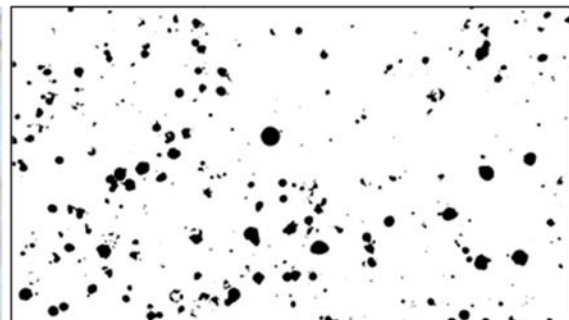
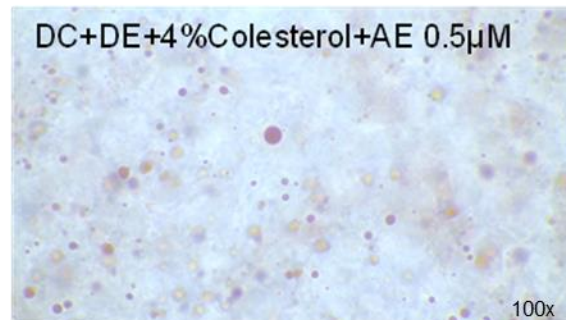
B Dieta Control Solvente (DC+DE)



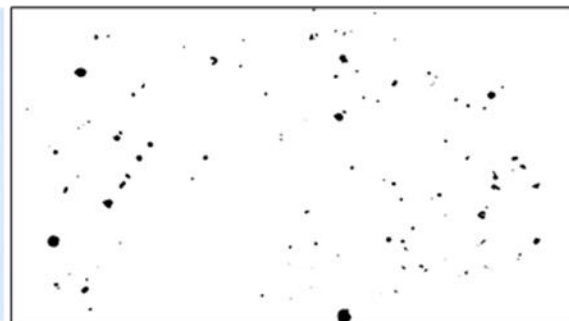
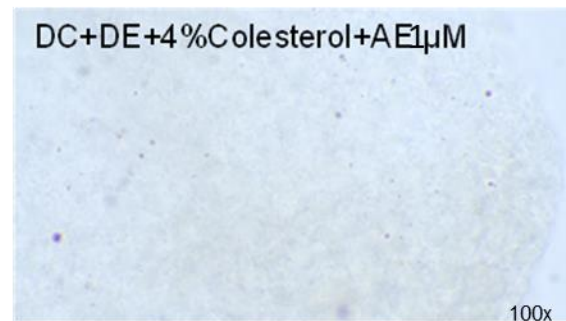
C DC+DE+4% Colesterol



D DC+DE+4% Colesterol+AE 0.5μM



E DC+DE+4% Colesterol+AE 1μM



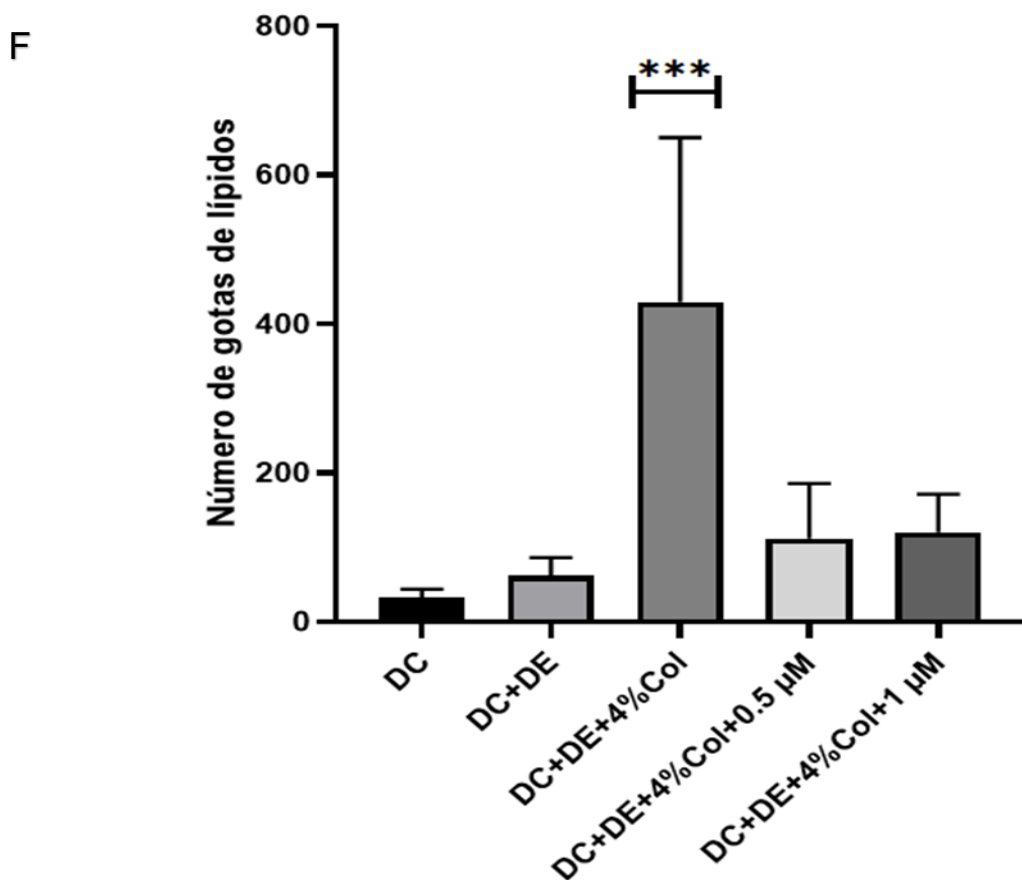


Figura 18: Depósitos lipídicos hepáticos en larvas de pez cebra alimentadas con diferentes dietas y tratadas con Aloe emodina.

Larvas de pez cebra alimentadas con: (A) DC, (B) DC+DE, (C) DC+DE+4%Col, además se administraron diferentes dosis de AE a grupo de larvas alimentadas con dieta suplementada con 4% de colesterol (D) DC+DE+4%Col + AE 0,5 µM y (E) DC+DE+4%Col + AE 1 µM. Se presentan microfotografías representativas del hígado teñido con Oil Red-O en microscopía de campo claro (UPRIGHT, 100×) y la correspondiente segmentación binarizada con ImageJ utilizada para el recuento de gotas lipídicas. El gráfico muestra en número de gotas lipídicas en el área de cuantificación por condición experimental. Media ± DE. N=7. ANOVA de una vía.

DISCUSIÓN

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por la acumulación progresiva de lípidos y células inmunitarias en la pared arterial, proceso que culmina en la formación de placas ateromatosas capaces de comprometer el flujo sanguíneo y desencadenar eventos cardiovasculares mayores. Debido a que esta patología se desarrolla de manera lenta y generalmente asintomática en sus etapas iniciales, el estudio de los mecanismos tempranos de la aterogénesis continúa representando un desafío en investigación cardiovascular.

En este contexto, el uso de modelos experimentales que permitan estudiar estos eventos iniciales de forma controlada resulta fundamental. El pez cebra (*Danio rerio*) se ha consolidado como un modelo vertebrado ampliamente utilizado en estudios de metabolismo lipídico y enfermedades cardiovasculares, debido a su similitud genética y fisiológica con humanos, su rápido desarrollo embrionario y la posibilidad de observar procesos celulares y vasculares *in vivo* mediante técnicas de microscopía y líneas transgénicas fluorescentes (Schlegel, 2016)(Tang et al., 2021). En particular, la inducción de dislipidemia mediante dietas enriquecidas con colesterol en larvas de pez cebra ha demostrado reproducir características tempranas de la aterogénesis, incluyendo acumulación lipídica vascular, infiltración de células inflamatorias y alteraciones metabólicas comparables a las descritas en modelos murinos y en humanos (Stoletov et al., 2009).

Bajo este marco experimental, la presente tesis evaluó los efectos del compuesto natural aloe-emodina sobre distintos parámetros asociados a procesos tempranos de aterogénesis en larvas de pez cebra alimentadas con una dieta suplementada con colesterol. De manera general, los resultados obtenidos permiten destacar cuatro hallazgos principales: (1) la aloe-emodina presentó un perfil de seguridad adecuado en el rango de concentraciones evaluado; (2) la dieta suplementada con colesterol indujo acumulación lipídica hepática y vascular junto con una respuesta inflamatoria medible; (3) el tratamiento con aloe-emodina redujo la acumulación lipídica en hígado y vasculatura; y (4) el compuesto mostró un efecto modulador sobre la respuesta inflamatoria, evidenciado por la disminución en el número de granulocitos en la región

vascular. En conjunto, estos resultados sugieren que la aloe-emodina podría ejercer efectos moduladores sobre procesos metabólicos e inflamatorios implicados en la aterogénesis temprana.

Evaluación de toxicidad y efectos subletales de aloe emodina

El primer objetivo del estudio consistió en determinar el perfil toxicológico de la aloe-emodina en larvas de pez cebra. Los resultados obtenidos indican que concentraciones iguales o inferiores a 2 μM no inducen mortalidad significativa ni alteraciones morfológicas o conductuales evidentes tras 24 y 48 horas de exposición continua. Solo a la concentración de 4 μM se observó ausencia de movimiento en un número reducido de larvas tras 48 horas de exposición, lo que sugiere la existencia de un umbral de toxicidad cercano al límite superior del rango experimental evaluado. Estos resultados permiten definir un intervalo de concentraciones sub-tóxicas adecuado para evaluar posibles efectos biológicos del compuesto sin comprometer la viabilidad del modelo.

El modelo larvario de pez cebra constituye una herramienta ampliamente utilizada para el estudio de procesos fisiopatológicos hepáticos durante etapas tempranas del desarrollo. La morfogénesis primaria del hígado se completa aproximadamente a las 48 horas post-fertilización (hpf) y el órgano alcanza un estado funcional hacia las 72 hpf, momento en el cual presenta una organización anatómica, composición celular y funciones metabólicas comparables a las observadas en mamíferos (He et al., 2013). Por esta razón, la exposición experimental a compuestos bioactivos durante el periodo comprendido entre 3 y 5 días post-fertilización (dpf) permite evaluar sus efectos sobre un hígado metabólicamente activo, minimizando posibles interferencias derivadas del proceso de organogénesis.

Dentro de los indicadores utilizados para evaluar alteraciones hepáticas en pez cebra, la acumulación de lípidos en hepatocitos ha sido ampliamente descrita como un marcador

temprano de disfunción metabólica. La acumulación excesiva de triglicéridos constituye una característica central de la esteatosis hepática y puede manifestarse mediante el aumento de depósitos lipídicos intracelulares o cambios en la morfología del órgano (Schneider et al., 2017; Cornet et al., 2017). En concordancia con estos antecedentes, diversos estudios toxicológicos han demostrado que la exposición de larvas de *Danio rerio* a diferentes xenobióticos puede inducir alteraciones hepáticas detectables mediante cambios en los depósitos lipídicos hepáticos, particularmente en el tamaño o número de gránulos lipídicos.

En este sentido, investigaciones realizadas con ficotoxinas marinas han demostrado que la exposición de larvas de pez cebra a partir de 5 dpf durante 24 horas a concentraciones del orden de 0,012–0,02 $\mu\text{g/mL}$ puede generar alteraciones hepáticas detectables, evidenciadas principalmente por el aumento en el tamaño de los gránulos lipídicos, lo cual ha sido propuesto como un marcador sensible de daño hepático temprano (Pepe, 2012). En comparación con estos antecedentes, los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que la exposición a aloe-emodina en concentraciones entre 0,1 y 2 μM no produjo alteraciones hepáticas detectables, lo que sugiere que este rango de concentración se mantiene dentro de un umbral sub-tóxico para el modelo larvario.

Sin embargo, al evaluar concentraciones superiores (3–4 μM) se observó un incremento en el número de gránulos lipídicos a nivel hepático, lo que podría interpretarse como un indicio temprano de alteración en la homeostasis lipídica del tejido hepático. Este tipo de cambios morfológicos ha sido descrito como una de las primeras manifestaciones de estrés metabólico hepático inducido por compuestos xenobióticos. Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que los efectos hepáticos de la aloe-emodina podrían presentar un comportamiento dependiente de la concentración, manifestándose inicialmente mediante alteraciones sutiles en la acumulación lipídica antes de la aparición de efectos tóxicos más severos.

Estos hallazgos son consistentes con estudios *in vitro* que describen un comportamiento dosis-dependiente de la aloe-emodina. Se ha demostrado que este compuesto presenta efectos citotóxicos principalmente en líneas celulares tumorales a concentraciones superiores a 10–20 μM , mientras que concentraciones menores pueden inducir

respuestas celulares adaptativas relacionadas con mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo sin comprometer significativamente la viabilidad celular (Luo et al., 2024). En este contexto, el rango de concentraciones sub-tóxicas identificado en el presente estudio resulta coherente con la literatura y respalda su utilización en ensayos funcionales orientados a evaluar efectos biológicos específicos de la aloe-emodina en el metabolismo hepático.

En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que la evaluación morfológica de los depósitos lipídicos hepáticos, particularmente mediante el análisis del tamaño o número de gránulos lipídicos, constituye una herramienta sensible para detectar alteraciones tempranas en la homeostasis lipídica hepática en el modelo larvario de pez cebra. Asimismo, estos hallazgos aportan evidencia que respalda la utilidad de este modelo experimental para el estudio de los efectos hepáticos de compuestos bioactivos y para el desarrollo de aproximaciones complementarias en la evaluación temprana de hepatotoxicidad inducida por xenobióticos.

Respuesta de estrés hepático inducida por aloe emodina

El análisis de la respuesta de estrés hepático mediante larvas transgénicas de la cepa *hsp70: GFP* permitió evaluar la activación de mecanismos celulares de protección frente a la exposición a aloe-emodina. La proteína HSP70 constituye un marcador ampliamente utilizado de estrés celular, ya que su expresión se incrementa frente a estímulos capaces de alterar la homeostasis proteica, incluyendo estrés oxidativo, exposición a xenobióticos y cambios metabólicos (Yamashita et al., 2010)(Basu et al., 2002).

Los resultados obtenidos mostraron un aumento significativo de la expresión de GFP hepática que reporta la expresión *in vivo* del gen *hsp70* en las larvas expuestas a 1 y 2 μM de aloe-emodina tras 24 horas de exposición. Este resultado sugiere la activación de mecanismos de respuesta al estrés celular. Sin embargo, esta respuesta se atenuó a las 48 horas, manteniéndose significativa únicamente a la concentración de 2 μM . Este patrón temporal sugiere una respuesta adaptativa del tejido hepático frente al compuesto, más que un daño hepático persistente.

Este tipo de respuesta transitoria ha sido descrito previamente en estudios con compuestos bioactivos en modelos de pez cebra, donde la activación de proteínas de choque térmico, como HSP70, forma parte de un mecanismo celular adaptativo frente a estímulos de estrés. La inducción de estas proteínas ocurre en respuesta a diversos factores ambientales o químicos, incluyendo cambios de temperatura, radiación y exposición a compuestos tóxicos, y cumple un rol central en la mantención de la homeostasis celular mediante funciones de chaperona molecular que previenen el plegamiento incorrecto y la agregación de proteínas (Yamashita et al., 2010).

En este contexto, una activación transitoria de hsp70 puede reflejar la activación de mecanismos citoprotectores capaces de restaurar el equilibrio celular tras exposiciones subletales. Por lo tanto, la posterior disminución de su expresión no necesariamente implica ausencia de estrés celular, sino que podría indicar que el sistema de respuesta al estrés logró compensar el estímulo inicial y restablecer la homeostasis. En el caso de la aloe-emodina, la activación observada podría estar asociada a la activación de mecanismos antioxidantes y de detoxificación hepática que limitan el daño celular inducido por el compuesto.

Inducción de acumulación lipídica por dieta suplementada con colesterol

La alimentación de larvas de pez cebra con dieta suplementada con colesterol produjo una acumulación de depósitos lipídicos en hígado y sistema vascular, evidenciada mediante tinciones Oil Red O y Sudan Black. Este hallazgo confirma la validez del modelo dietario utilizado para reproducir alteraciones metabólicas tempranas compatibles con procesos aterogénicos.

En larvas de pez cebra, la alimentación a partir de 5 días post-fecundación (dpf) coincide con el inicio de la alimentación exógena y la maduración funcional del sistema digestivo, lo que permite la absorción intestinal de lípidos y su posterior transporte a través del sistema circulatorio.

Estudios previos han demostrado que dietas enriquecidas con colesterol pueden inducir rápidamente acumulación lipídica en vasos sanguíneos y tejido hepático en el modelo de

pez cebra (Stoletov et al., 2009; Fang et al., 2011). No obstante, en el presente estudio no se observaron cambios estadísticamente significativos en algunos parámetros bioquímicos clásicos de daño hepático, lo que podría explicarse por el carácter temprano del modelo experimental y la duración relativamente corta del periodo de exposición (10 días). En etapas iniciales del daño hepático, la acumulación lipídica a nivel tisular puede preceder a las alteraciones detectables en marcadores séricos, reflejando una disociación temporal entre los cambios morfológicos locales y las alteraciones metabólicas sistémicas (Stoletov, y otros, 2009).

En este contexto, es posible que las modificaciones bioquímicas aún no alcancen niveles detectables en este periodo experimental, mientras que ciertos marcadores asociados a la respuesta inflamatoria pueden activarse de manera más temprana como parte de los mecanismos iniciales de respuesta frente a la alteración metabólica.

Efecto de aloe emodina sobre acumulación lipídica hepática y vascular

El tratamiento con aloe-emodina mostró un efecto dependiente de la concentración sobre la acumulación lipídica. Mientras que la concentración de 0,5 μM no produjo cambios significativos, la administración de 1 μM se asoció a una reducción significativa de los depósitos lipídicos hepáticos y vasculares en larvas alimentadas con dieta alta en colesterol.

Aunque la evidencia en modelos de pez cebra es aún limitada, diversos estudios en modelos animales y celulares han demostrado que la aloe-emodina puede modular el metabolismo lipídico mediante la regulación de rutas metabólicas asociadas a la homeostasis lipídica, incluyendo activación de procesos de autofagia y regulación de genes implicados en el transporte y almacenamiento de lípidos. En hepatocitos, por ejemplo, se ha descrito que la aloe-emodina puede reducir la acumulación de lípidos intracelulares mediante la activación de mecanismos de degradación lipídica y regulación de factores de transcripción metabólicos. (Fang, Liu, & Miller, 2014)

Estos hallazgos sugieren que el efecto hipolipemiante observado en el presente estudio podría estar relacionado con mecanismos similares de regulación metabólica, aunque

estudios mecanísticos adicionales serían necesarios para confirmar estas hipótesis en el modelo de pez cebra.

Respuesta inflamatoria y modulación por aloe emodina

El aumento significativo del número de granulocitos en la región de la vena cardinal en larvas alimentadas con dieta alta en colesterol refleja la activación de la respuesta inflamatoria innata. En el contexto de la aterogénesis, la infiltración de células inmunitarias constituye uno de los eventos tempranos que contribuyen al establecimiento del proceso inflamatorio en la pared vascular.

En modelos de pez cebra se ha demostrado que dietas enriquecidas con colesterol inducen el reclutamiento de células mieloides hacia regiones vasculares con acumulación lipídica, reproduciendo fenómenos inflamatorios comparables a los descritos en modelos murinos de aterosclerosis (Stoletov et al., 2009). Asimismo, se ha descrito que citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β pueden inducir la expresión de factores quimiotácticos en células endoteliales, favoreciendo el reclutamiento inicial de neutrófilos y otras células mieloides hacia el endotelio activado. (Luo et al., 2019)

En este sentido, se ha propuesto que durante las etapas tempranas de la aterogénesis ocurre una secuencia de eventos caracterizada por inflamación endotelial, acumulación de neutrófilos y posterior depósito de lípidos, seguida por la infiltración de macrófagos en las lesiones vasculares. Considerando que en el presente estudio neutrófilos y macrófagos se agrupan dentro del recuento de granulocitos, el aumento observado en este parámetro podría reflejar la activación de estos procesos inflamatorios tempranos inducidos por la dieta alta en colesterol. (Luo et al., 2019)

Por otra parte, la disminución significativa del número de granulocitos tras el tratamiento con aloe-emodina sugiere un efecto modulador sobre la respuesta inflamatoria. Este resultado es coherente con estudios previos que describen propiedades antiinflamatorias de la aloe-emodina, mediadas en parte por la inhibición de vías de señalización proinflamatorias como NF- κ B y la reducción en la producción de citocinas inflamatorias. (Quan et al., 2019)

Alteraciones morfométricas inducidas por dieta y tratamiento

Las modificaciones observadas en la longitud larvaria total y en los parámetros morfométricos vasculares evidencian que la dieta alta en colesterol puede inducir cambios estructurales medibles durante el desarrollo larvario. En este contexto, la utilización de una dieta suplementada con colesterol constituye una estrategia experimental ampliamente empleada para inducir alteraciones metabólicas que simulan condiciones de hiperlipidemia y permiten reproducir eventos tempranos de la aterogénesis en modelos animales. En larvas de pez cebra, este tipo de intervención dietaria facilita la generación de un ambiente metabólico caracterizado por un aumento en la disponibilidad de lípidos circulantes, lo que promueve procesos de inflamación vascular, infiltración de células inmunes y acumulación lipídica en el endotelio lo que indicaría el cambio en la longitud observada en los resultados obtenidos. (Luo et al., 2019)

En otros estudios se ha planteado que alteraciones metabólicas inducidas por dietas hiperlipídicas pueden afectar el crecimiento y el desarrollo en organismos modelo, probablemente a través de modificaciones en la disponibilidad energética y en la regulación hormonal del crecimiento. (Fuentes., 2024)

Los resultados del presente estudio, donde el tratamiento con aloe-emodina (AE) atenuó parcialmente las alteraciones morfológicas vasculares inducidas por la dieta alta en colesterol, son concordantes con estudios previos que describen su potencial efecto antiaterogénico. En modelos murinos de aterosclerosis se ha demostrado que la AE reduce la formación de lesiones, la acumulación lipídica y la infiltración de células inflamatorias, además de mejorar el perfil lipídico. Estos efectos se han asociado a la modulación de vías clave del metabolismo del colesterol, particularmente a través de la inhibición de SREBP-2, HNF1 α y PCSK9, lo que favorece la regulación positiva del receptor LDLR y la captación de LDL (Su et al., 2020). En conjunto, estos mecanismos podrían explicar la atenuación parcial de los cambios vasculares observados en este modelo, consistente con lo descrito para compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias que influyen en procesos de remodelación tisular y crecimiento vascular. (X. Tang et al., 2022)

CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos permiten aceptar la hipótesis de investigación, evidenciando que el aloe emodina reduce la acumulación lipídica y la respuesta inflamatoria perivascular asociada a etapas tempranas de la aterogénesis en larvas de pez cebra alimentadas con dieta alta en colesterol.
2. La evaluación de toxicidad subletal a 24 y 48 horas de exposición continua demostró que el aloe emodina no genera alteraciones morfológicas ni conductuales relevantes en la mayoría de las concentraciones evaluadas, estableciéndose que concentraciones $\leq 2 \mu\text{M}$ corresponden a un rango sub-tóxico adecuado para estudios funcionales posteriores, mientras que $4 \mu\text{M}$ representa un umbral experimental de respuesta adversa.
3. La administración de una dieta suplementada con 4% de colesterol indujo cambios celulares y fenotípicos en las larvas, evidenciándose un aumento significativo de granulocitos en la región de la vena cardinal y un incremento de la longitud total larvaria, lo que confirma la capacidad del modelo dietario para generar respuestas inflamatorias y morfológicas asociadas a procesos aterogénicos tempranos.
4. El tratamiento con aloe emodina en larvas sometidas a dieta alta en colesterol produjo una disminución significativa del número de granulocitos en la región de la vena cardinal, lo que sugiere un efecto modulador sobre la respuesta inflamatoria inducida por el colesterol en el modelo larvario de pez cebra.
5. Bajo las condiciones experimentales evaluadas, el aloe emodina no modificó la supervivencia larvaria ni generó alteraciones significativas en los parámetros bioquímicos hepáticos o del perfil lipídico, aunque sí se observó una reducción significativa de la longitud larvaria en comparación con el grupo alimentado únicamente con colesterol, indicando un efecto fenotípico medible asociado al tratamiento.

En conjunto, los resultados de esta tesis demuestran que Aloe emodina presenta un perfil de seguridad adecuado en larvas de pez cebra a concentraciones sub-tóxicas y ejerce efectos biológicos medibles sobre acumulación lipídica, inflamación y morfología vascular en un modelo de dieta alta en colesterol.

El modelo de larva de pez cebra alimentada con dieta suplementada con colesterol se consolida como una herramienta experimental válida para el estudio de eventos tempranos asociados a la aterogénesis y para la evaluación de compuestos con potencial efecto modulador.

Finalmente, los resultados posicionan a Aloe emodina como un compuesto bioactivo de interés para estudios futuros orientados a la prevención o modulación temprana de procesos ateroscleróticos.

BIBLIOGRAFÍA

- C. Cárdenas, A. R. (31 de October de 2006). Evaluation of the anti-angiogenic effect of aloe-emodin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 7.
- Chapman, M. (1986). Comparative analysis of mammalian plasma lipoproteins. *Methods in Enzymology*, 70-143.
- Chen, L., Qin, L., & Liu, X. a. (2019). CTRP3 Alleviates Ox-LDL-Induced Inflammatory Response and Endothelial Dysfunction in Mouse Aortic Endothelial Cells by Activating the PI3K/Akt/eNOS Pathway. *Inflammation*, 42(4), 1350-1359.
- Concha, M. M. (2023). Búsqueda mediante virtual screening de moléculas capaces de interactuar con Lox-1 para su potencial uso terapéutico. Chile, Valparaíso.
- Crowhurst, M., Layton, J., & Lieschke., G. (2002). Developmental biology of zebrafish myeloid cells. *Int J Dev Biol*, 46(4), 483-492.
- Fang, L., Liu, C., & Miller, Y. (2014). Zebrafish models of dyslipidemia: relevance to atherosclerosis and angiogenesis. *Translational Research*, 163(2), 99-108.
- Fehrmann-Cartes, K., Coronado, M., Hernández, A. J., Allende, M. L., Feijoo, C. G., & al, e. (2019). Anti-inflammatory effects of aloe vera on soy meal-induced intestinal inflammation in zebrafish. *Fish & shellfish immunology*, 9, 564-573. doi: <https://doi.org/10.10>
- Frostegard, J., Haegerstrand, A., Gidlund, M., & Nilsson, J. (1991). Biologically modified LDL increases the adhesive properties of endothelial cells. *Atherosclerosis*, 90, 119-126.
- Fuentes., A. A. (2024). Implementación de un modelo en pez cebra (Danio Renio) de aterogénesis temprana inducido por dieta alta en grasa.

- Guiomar Mendieta MD, P. M., PDPil, S. P., BS, V. M., Borja Ibáñez MD, P., Valentin Fuster MD, P., Inés García-Lunar MD, P., . . . al., E. (28 de Noviembre de 2023). Determinantes de progression y regression de la atherosclerosis subclinical a lo largo de 6 años. *Journal of the American College of Cardiology*, 82(22), 2069-2083.
- Han, J., R, Z., X, Z., J, D., M, C., Y, P., . . . al., e. (2021). Zebrafish Model for Screening Antiatherosclerosis Drugs. *Oxid Med Cell Longev*.
- Khor, E., & Noor, S. a. (2019). Understanding the role of ztor in aging-related diseases using the zebrafish model. *In vivo*, 33(6), 1713-2000.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., Schilling, T. F., & al, e. (July de 1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3), 253-310.
- Libby, P., Ridker, P. M., & Hansson, G. K. (Mayo de 2011). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*.
- Loaiza, D. J. (2001). Fisiopatología de la ateroescclerosis, primera parte. *Revista Costarricense de Cardiología*, 3.
- Luo, H., Ji, X., Zhang, M., Ren, Y., Tan, R., Jiang, H., & Wu, X. (Octubre de 2024). Aloe-emodin: Progress in Pharmacological Activity, Safety, and Pharmaceutical Formulation Applications. *Medicinal Chemistry*, 24(19), 1784-1798.
- Mejías, C. M., & Suárez., C. A. (Octubre de 2002). Identificación de células inflamatorias en aortas de fetos, neonatos y lactantes menores. Una aproximación al estudio de la génesis de la ateroescclerosis humana. *Scielo*, 110.

- MINSAL, M. d. (2015). *Ministerio de Salud de Chile*. Obtenido de Ministerio de Salud de Chile: <https://www.gob.cl/ministerios/ministerio-de-salud/>
- OMS, O. M. (25 de Agosto de 2021). *Organización panamericana de la Salud (OPS)*. Obtenido de <https://www.who.int/es>
- Otis, J., Zeituni, E., Thierer, J., Anderson, J., Brown, A., Boehm, E., & al., e. (2005). Zebrafish as a model for apolipoprotein biology: comprehensive expression analysis and a role for ApoA-IV in regulating food intake. *Dis Model Mech*, 8(3), 295-309.
- Ouguerram, K., & Magot, C. a. (1991). Alterations in cholesterol metabolism in the genetically hypercholesterolemic RICO rat: an overview. *Hypercholesterolemia, hypocholesterolemia, hypertriglyceridemia*, 257-274.
- Pepe, V. P. (Abril de 2012). "INDICADORES DE DAÑO HEPÁTICO POR ÁCIDO OKADAICO EN LARVAS DE PEZ CEBRA (*Danio rerio*)". 54.
- Quan, Y., Gong, L., He, J., Zhoe, Y., Liu, M., Li, Y., . . . Cao, Z. (Mayo de 2019). Aloe emodin induces hepatotoxicity by activating NF- κ B inflammatory pathway and P53 apoptosis pathway in zebrafish. *Toxicology Letters*, 306, 66-79.
- Quinn, M. T. (1987). Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2995-2998.
- Ruiza, A. B., & Radosa, D. Z. (2002). La placa aterogénica: fisiopatología y consecuencias clínicas. *Elsevier*, 394-405.

Stoletov, K., Fang, L., Choi, S., Hartvigsen, K., LF, H., C, H., . . . al., e. (2009). Vascular lipid accumulation, lipoprotein oxidation, and macrophage lipid uptake in hypercholesterolemia Zebrafish. *104*(8), 60-95.

Target Mol. (8 de enero de 2026). Obtenido de <https://www.targetmol.com/compound/aloe%20emodin>

Thanassoulis, G., & Aziz., H. (septiembre de 2022). *Atherosclerosis*. Obtenido de Manual MSD: <https://www.msdmanuals.com/es/hogar/trastornos-del-coraz%C3%B3n-y-los-vasos-sangu%C3%ADneos/ateroesclerosis/ateroesclerosis>

Wang, K., Fang, X., Ma, N., Lin, Q., Huang, Z., Liu, W., & al., e. (2015). Myeloperoxidase-deficient zebrafish show an augmented inflammatory response to challenge with *Candida albicans*. *Fish. Shellfish Immunology*, 109-116.

Xiaoxv Dong, Y. Z. (2020). Aloe-emodin: A review of its pharmacology, toxicity, and pharmacokinetics. *Pudmed*.

Xueqing Tang, Y. Z. (2022). Aloe-emodin derivative produces anti-atherosclerosis effect by reinforcing AMBRA1-mediated endothelial autophagy. *European Journal of Pharmacology*.

Yang Yu, H. L. (2019). Aloe-Emodin Attenuates Myocardial Infarction and Apoptosis Via Up-Regulating MiR-133 Expression.

ANEXO 1

Eliminación de material con residuos biológicos, químicos o radioactivos. Toda gestión, manejo, acopio temporal y eliminación de residuos provenientes del proyecto se registrarán por el manual de manejo de residuos peligrosos de la Universidad de Concepción y cumpliéndose el decreto supremo N°148/2003 – “Reglamento sanitario sobre manejo de residuos peligrosos”. Y siguiendo las indicaciones por MATPEL.



CLASIFICACIÓN Y MANEJO DE RESIDUOS BIOLÓGICOS



Tipo de Residuo	Definición	Almacenamiento y Retiro	Contenedor o bolsa
Residuos biológicos (tipo 1)	Corresponden SOLO a tejidos humanos, restos de tejidos humanos, materiales contaminados con fluidos humanos (sangre, orina) y restos de animales contaminados con bacterias o virus patógenos.	Deben ser almacenados a temperaturas inferiores a 4°C hasta ser retirados por la unidad RESPEL o empresa externa*.	Bolsa de autoclave amarilla 
Residuos cortopunzantes biológicos (tipo 2)	Corresponden a materiales cortopunzantes (agujas, lancetas, hojas de bisturí, escalpelos) que se han utilizado con fluidos y tejidos humanos o en disecciones de animales contaminados con bacterias o virus patógenos.	Deben ser almacenados a temperaturas inferiores a 4°C hasta ser retirados por la unidad RESPEL o empresa externa*.	Caja cortopunzante amarilla 
Residuos bio-inertes (tipo 3)	Corresponden a animales o restos de animales de experimentación que NO están contaminados con bacterias o virus patógenos u otras sustancias peligrosas.	Deben ser almacenados en bolsas para residuos inertes color negro, resistente al volumen y peso del residuo, a temperaturas inferiores a 4°C hasta ser retiradas por la unidad RESPEL para su disposición final. En caso de que el residuo corresponda a una muestra preservada, se debe separar de la fracción líquida (ej. formalina, alcohol), la que debe ser almacenada como residuo químico.	Bolsa para residuos inertes color negro 
Residuos cortopunzantes inertes (tipo 4)	Corresponden a materiales cortopunzantes (agujas, lancetas, hojas de bisturí, escalpelos) que NO han estado en contacto con tejidos humanos, restos de tejidos humanos, fluidos humanos (sangre, orina), ni restos de animales contaminados con bacterias o virus patógenos.	Deben ser almacenados en contenedores plásticos de 4 u 8 kg, etiquetados como "Cortopunzante inerte", hasta ser retirados por la unidad RESPEL para su disposición final	Contenedor plástico 4 u 8 kg 
Residuos microbiológicos (tipo 5)	Corresponden a materiales de cultivo que han estado en contacto con bacterias no patógenas y que han sido inactivados por esterilización con autoclave o por desinfección en un baño con solución de hipoclorito de sodio.	Deben ser entregados a la unidad RESPEL, SOLO después de ser inertizados mediante autoclave o desinfectados en un baño con solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 1 hora. En caso contrario, no se procederá con el retiro. La unidad RESPEL entregará bolsas de autoclave solo cuando éste sea el método utilizado de inactivación.	Bolsa de autoclave transparente o blanca (solo para autoclave) 

(*) El retiro desde la Facultad de Medicina, Facultad de Odontología, DISE y Centro RAI, será una vez a la semana a través de empresa externa Stericycle y la unidad RESPEL. El resto de las facultades que generen este tipo de residuos deberá gestionar retiro mensual a través de la unidad RESPEL.

Instructivo elaborado en colaboración con la Facultad de Ciencias Biológicas.

Revisado 15-01-2016

ANEXO 2

Aprobación de comité de ética para el trabajo con animales de investigación



Universidad de Concepción
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo
Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales

Considerando que el **VRID N° 2023000931INT**, titulado **“EVALUACIÓN DE INHIBIDORES DE LOX-1 GENERADOS POR VIRTUAL SCREENING EN MODELOS CELULARES Y ANIMALES PARA LA PREVENCIÓN DE LA ATROSCLEROSIS”** presentado por el **DR. CLAUDIO AGUAYO TAPIA**, no muestra elementos que puedan transgredir a las pautas éticas y bioéticas rectoras de nuestra Institución Universitaria y a los principios éticos y bioéticos establecidos en la Declaración de Singapur sobre la Integridad en la Investigación, la Ley N° 20.380 sobre Protección de Animales, la prohibición expresa de la Ley N° 21.646 del año 2024, sobre la experimentación en animales, también adopta, hasta su conclusión, las normas previstas en revisión y evaluación inicial, la Ley N° 20.393, que establece la responsabilidad penal de las personas jurídicas en los delitos que indica, así como también sigue el Reglamento de Manejo de Residuos Peligrosos de la Vicerrectoría de Asuntos Económicos y Administrativos - Plan de Manejo de Sustancias y Residuos Peligrosos (MATPEL – RESPEL/ SUSPEL) institucional y, observa además, las regulaciones legales nacionales, el Manual de Normas de Bioseguridad y Riesgos Asociados (2018), formalizado por CONICYT y adoptado por ANID, este Comité concluye que la evaluación a la cual fue sometido, proporcionó una base suficiente para conferir el presente **Certificado de Aprobación Inicial**.

DR. RENÉ EDGARDO ORTEGA VÁSQUEZ
MÉDICO VETERINARIO

DIRECTOR

COMITÉ INSTITUCIONAL DE CUIDADO Y USO DE ANIMALES

CICUA-UDEC

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN





Universidad de Concepción
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo
Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales

CICUA 2007-2025. C.

Concepción, 19 de marzo de 2025.

CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Concepción ha revisado el **VRID Nº 2023000931INT**, adjudicado con el **Fondo VRID INVESTIGACIÓN INTERDISCIPLINARIA** de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de nuestra casa de estudios, titulado **“EVALUACIÓN DE INHIBIDORES DE LOX-1 GENERADOS POR VIRTUAL SCREENING EN MODELOS CELULARES Y ANIMALES PARA LA PREVENCIÓN DE LA ATROSCLEROSIS”**, presentado por el **DR. CLAUDIO AGUAYO TAPIA** en calidad de Investigador Responsable, adscrito al Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción, y ha comprobado que cumple con las normas y principios éticos, bioéticos y procedimientos de bioseguridad establecidos nacional e internacionalmente para investigación científica que considera el uso de seres vivos acuáticos, en este caso Pez cebra (*Danio rerio*), y el manejo de residuos correspondientes, tanto biológicos como químicos.

El proyecto propone “Evaluar el efecto de inhibidores farmacológicos dirigidos contra Lox-1 en células endoteliales, monocitos y un modelo de aterogénesis temprana en pez cebra”, a través de 02(dos) objetivos específicos (O.E.): 1) “Evaluar la actividad inhibitoria de Lox-1 de nuevos compuestos en ensayos celulares relacionados con la aterosclerosis” y 2) “Investigar el efecto antiaterogénico de los inhibidores in vivo utilizando un modelo de pez cebra”.

Para el cumplimiento del O.E. 1 se utilizará células endoteliales aórticas humanas (HAEC) en las que los efectos de los compuestos activos serán analizados por: i) efecto citotóxico; ii) Internalizaciones de dil-LDL; iii) formación de especies reactivas de oxígeno. iv) capacidad angiogénica en Matrigel. También se usará la línea celular de fagocitos THP1. Los macrófagos se obtendrán a partir de THP1 incubados con acetato de miristato de forbol y los efectos de los compuestos activos se analizarán mediante: i) ensayos de captación de Dil-ox-LDL y la acumulación de colesterol se determinará utilizando Oil Red O. ii) producción de citosinas, mediante matriz de perlas de citocinas.

En el caso del O.E. 2 se usarán larvas de 5 días post fecundación que se alimentarán con una dieta que contiene 4 % de grasa y 0 % de colesterol durante 10 días. Los individuos estarán expuestos a los compuestos activos identificados en los últimos 10 días de alimentación, mediante inmersión en concentraciones sub-letales previamente determinadas. Al finalizar el tratamiento, se determinarán los niveles de lipoproteínas en la biomasa total. Además, se evaluará la acumulación de colesterol en las arterias y marcadores de inflamación y disfunción endotelial.

Este proyecto cuenta con la Resolución aprobatoria del Comité de Ética de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción.

El tratamiento y disposición de los residuos biológicos y químicos generados en el desarrollo del proyecto serán observados según las materias reguladas en el Plan de Manejo de Sustancias y Residuos Peligrosos de la Vicerrectoría de Asuntos Económicos y Administrativos (MATPEL – RESPEL/ SUSPEL), y serán tratados conforme a las indicaciones del Manual de Normas de Bioseguridad y Riesgos Asociados (2018), normas adoptadas por ANID.

Barrio Universitario s/n,
Edificio Empredec
Fono (56-41) 2204302
Casilla 160 C – Correo 3, secrevrid@udec.cl
Concepción, Chile



ANEXO 3

Tinción de larvas de pez cebra 5-6 dpf con Sudan Black B

1. Fijar larvas en formalina 10% por 2h a temperatura ambiente (RT), o toda la noche (ON) a 4°C.
 2. Lavar en buffer fosfato salino (PBST) 3 veces por 5 min, en agitación constante (AC)
 3. Teñir con solución de trabajo Sudan Black B filtrada (ideal 0,45 μ m) por dos horas, en AC.
 4. Lavar por 5 min con etanol 70%. Observar bajo lupa, y repetir solo de ser necesario, en AC.
 5. Lavar en buffer fosfato salino (PBST) 3 veces por 5 min, en AC.
 6. Despigmentar en una solución de KOH 1%/H₂O₂ 3%, sin agitación por 5 min.
- NOTA 1:** Usar solución fresca, preparar justo antes de usar.
7. Lavar en PBS tres veces por 5 min, en AC.
 8. Almacenar en PFA 1% a 4°C en oscuridad.

NOTA: No usar todas las soluciones a temperatura ambiente.

Preparación SBB:

Stock: 0.18% (w/v) Sudan Black al 70% etanol (store at RT, Bueno por 1+ año).

Solución de trabajo: 10 ml stock + 40ml 70% etanol + 50 μ l fenol (Store at RT, Bueno por 6+ meses).

J.De la Paz,2021.

ANEXO 4

Tinción de larvas de pez cebra con RedOil

1. Fijar larvas en PFA 4% por 2h a temperatura ambiente (RT), o toda la noche a 4°C.
2. Lavar en buffer fosfato salino (PBST) 3 veces por 5 min, en AC.
3. Despigmentar en una solución de KOH 1%/H₂O₂ 3%, sin agitación por 10-12 min.

NOTA: Usar solución fresca, preparar justo antes de usar.

4. Lavar en PBS tres veces por 5 min, en AC.
5. Deshidratar en propilenglicol 75% por 10 min, en AC.
6. Deshidratar en propilenglicol 100% por 10 min, en AC.
7. Teñir con solución de RedOil al 0.5% en Propilenglicol 100% en AC, toda la noche.
8. Lavar con propilenglicol 100% por 15 min dos veces, en AC.
9. Rehidratar en propilenglicol 75% por 25 min, en AC.
10. Rehidratar en propilenglicol 50% por 25 min, en AC.
11. Almacenar en glicerol 80% a 4°C en oscuridad.

NOTA: No usar todas las soluciones a temperatura ambiente.

NOTA : Usar solución filtrada (ideal 0,45 µm) almacenada a RT en oscuridad. Duración aproximada en estas condiciones 5-6 días.

J.De la Paz,2021.

ANEXO 5

Doble tinción de larvas de pez cebra con Sudan Black B y RedOil

1. Fijar larvas en PFA 4% por 2h a temperatura ambiente (RT), o toda la noche a 4°C.
2. Lavar en buffer fosfato salino (PBST) 3 veces por 5 min, en agitación constante (AC)
3. Teñir con solución de trabajo Sudan Black B filtrada (ideal 0,45 μ m) por dos horas en AC.
4. Lavar por 5 min con etanol 70%. Observar bajo lupa, y repetir solo de ser necesario en AC.
5. Lavar en buffer fosfato salino (PBST) 3 veces por 5 min, en AC.
6. Despigmentar en una solución de KOH 1%/H₂O₂ 3%, sin agitación por 10-12 min.

NOTA 1: Usar solución fresca, preparar justo antes de usar.

7. Lavar en PBS tres veces por 5 min, en AC.
8. Deshidratar en propilenglicol 75% por 10 min, en AC.
9. Deshidratar en propilenglicol 100% por 10 min, en AC.
10. Teñir con solución de RedOil al 0.5% en Propilenglicol 100% en AC, toda la noche.

NOTA 2: Usar solución filtrada (ideal 0,45 μ m) almacenada a RT en oscuridad.

Duración aproximada en estas condiciones 5-6 días.

11. Lavar con propilenglicol 100% por 15 min dos veces, en AC.
12. Rehidratar en propilenglicol 75% por 25 min, en AC.
13. Rehidratar en propilenglicol 50% por 25 min, en AC.
14. Almacenar en glicerol 80% a 4°C en oscuridad.

NOTA: No usar todas las soluciones a temperatura ambiente.

J.De la Paz,2021.

ANEXO 6

Protocolo de evaluación de partículas a partir de microfotografías

Ajustado para evaluar gránulos de lípidos en hígado de pez cebra teñidas con RedOil, aplastados.

PROCEDIMIENTOS

- I. Disección y montaje de los hígados
- II. Captura de imágenes

Tomar las fotos con buena resolución, mismo aumento y sin cambiar las condiciones de luminosidad ente cada muestra. Formato TIFF.

- III. Abrir la imagen en image J
 1. Pasar a 8 bit.
 2. Sacar la metadata
 3. Median 1,0 pixeles
 4. Subtrack background 50 pixeles
 5. Theshold (0-247)
 6. Close. Whatershed
 7. Analyse particles

J.De la Paz,2021.

ANEXO 7

CARTA GANTT

Tesis de magister: Efectos de Aloe emodina en la aterosclerosis temprana inducida en modelo de larva de pez cebra con dieta alta en colesterol.

2025														2026		
Actividades	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar			
Diseño experimental y preparación inicial	X															
Defensa de plan de trabajo de tesis		X														
Objetivo 1. Determinar las concentraciones sub-tóxicas de Aloe-emodina en larvas de pez cebra.																
Estandarización de las concentraciones de Aloe-emodina		X	X													
Cuantificación de número de muertes		X	X													
Determinación de hepatotoxicidad		X	X													
Objetivo 2. Determinar la acumulación de células inflamatorias y lípidos en la vasculatura y el hígado de larvas de pez cebra alimentadas con dieta alta en colesterol.																
Desarrollo de modelo de pez cebra con dieta alta en grasas				X	X	X	X	X	X	X						
Cuantificación de células inflamatorias.				X	X	X	X	X	X	X						
Realización de parámetros bioquímicos.				X	X	X	X	X	X	X						
Determinación de lípidos por histología				X	X	X	X	X	X	X						
Defensa de avance de tesis					X											
Objetivo 3. Analizar el efecto del tratamiento con Aloe-emodina sobre la acumulación de células inflamatorias y lípidos en larvas de pez cebra alimentadas con dieta alta en colesterol.																
Tratar con Aloe emodina a modelo de pez cebra con HCD.				X	X	X	X	X	X	X						
Cuantificación de células inflamatorias.				X	X	X	X	X	X	X						
Realización de parámetros bioquímicos.				X	X	X	X	X	X	X						
Determinación de lípidos por histología				X	X	X	X	X	X	X						
Análisis estadístico y elaboración de gráficos							X	X	X	X						
Elaboración de escrito y revisiones.									X	X	X					
Defensa final de tesis													X			

