



**UNIVERSIDAD CENTRAL  
DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**DAÑO MORFO-FUNCIONAL  
RETINAL OCASIONADO POR LA  
TOXICIDAD DE LA GLUCOSA EN  
EL MODELO LARVARIO DE PEZ  
CEBRA**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Aurora Del Valle Barrios Rudas como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

Tutor:

Dr. Marco Álvarez

CARACAS, VENEZUELA  
OCTUBRE - 2019

**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL  
DE GRADO DEL (A) Br. AURORA DEL VALLE BARRIOS RUDAS**

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado del (la) Br. Aurora Del Valle Barrios Rudas, C.I: 21.116.747, titulado **“DAÑO MORFO-FUNCIONAL RETINAL OCASIONADO POR LA TOXICIDAD DE LA GLUCOSA EN EL MODELO LARVARIO DE PEZ CEBRA”**, para optar al título de Licenciado (a) en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los 23 días del mes de Octubre del año 2019, dejando constar que la Prof. Mighay Lovera actuó como coordinadora del jurado examinador.



---

Prof. Elizabeth Merentes



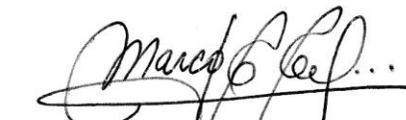
---

Prof. Maria Valentina Salas



---

Prof. Mighay Lovera  
(Tutor - Coordinador)



---

Prof. Marcos Alvarez  
(Tutor)

## AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas a las que debo agradecer porque han contribuido al proceso y conclusión de esta etapa. A mi familia; especialmente a mis padres, por su amor y apoyo incondicional en cada momento de mi vida. Sin su presencia, jamás habría llegado hasta aquí. A mi hermanito Nacho, por hacerme reír, por ser mi amigo y por estar siempre ahí, especialmente cuando la facultad era demasiado grande y sola. A mi abuela, que incluso cuando estaba en su propio mundo no dejaba de preguntarme por la universidad, y aunque ya no esté físicamente sé que está pendiente. A mi hermana de corazón Bárbara, que me ha demostrado que ni el tiempo ni la distancia son obstáculos para brindar apoyo cuando hay cariño y afecto de verdad. ¡A todos los amo infinitamente! A mis amigos, tanto fuera como dentro de la universidad, especialmente a mis queridas amigas Katherine, Mariana y Mafer, gracias por hacer este largo camino más llevadero.

A mi tutor, el Dr. Marco Álvarez por darme la oportunidad de trabajar como tesista en el *Laboratorio de Microscopia* del Instituto Anatómico “José Izquierdo” de la Facultad de Medicina de la Ilustre Universidad Central de Venezuela; por guiarme y enseñarme que las dificultades están para superarse, no para detenerse. A la profesora Eliana Navarro por ayudarme siempre que lo precisé y a la Sra. Lourdes Perdomo por apoyarme y escucharme cuando más lo necesité.

A los profesores Elizabeth Merentes, Valentina Salas, Lorena Márquez, José Mejías y Mighay Lovera, gracias por todo el tiempo invertido en guiarme hacia la excelencia en este trabajo especial de grado. A todos y cada uno de los profesores de las diferentes escuelas de la facultad de ciencias que contribuyeron en mi formación como profesional; y muy

especialmente a los profesores de la escuela de biología por su enseñanza, su dedicación, su ejemplo de perseverancia y su amor a esta profesión, infinitas gracias.

Y por último “A ti crisis. Por todo lo que das. Por todo lo que eres. Por la transformación que brindas: Una revolución y una evolución, en el amor y en la consciencia. Por la oportunidad que siempre ofreces, por la belleza y la vida que nacen de ti. Por todo, gracias.

A todo, si” *Álex Rovera*

## ÍNDICE

ÍNDICE.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
RESUMEN.....	3
I. INTRODUCCIÓN.....	4
I.1 Planteamiento del problema.....	4
I.2 Glucosa.....	5
I.3 Hiperglicemia y toxicidad de la glucosa.....	6
I.4 Modelo experimental.....	7
I.4.1 Pez cebra <i>Danio rerio</i> .....	8
II. ANTECEDENTES.....	13
III. HIPÓTESIS.....	14
IV. OBJETIVOS.....	15
IV.1. Objetivo General.....	15
IV.2. Objetivos Específicos.....	15
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
V.1 Manejo y mantenimiento del modelo animal experimental <i>Danio rerio</i> adulto bajo condiciones de laboratorio. ....	16
V.1.2 Puesta, obtención y limpieza de huevos fertilizados.....	17
V.1.3 Selección de embriones.....	18
V.2. Estimación del rango de CT de la glucosa.....	18
V.3 Parámetros de análisis funcional.....	19
V.3.1 Ensayos de respuesta motora a un estímulo lumínico.....	19
V.4 Parámetros de análisis morfológico.....	23
V.4.1 Morfometría Corporal.....	25
V.4.2 Morfometría Craneal.....	25
V.4.3. Arquitectura de la microvasculatura ocular.....	26
V.5 Análisis de datos.....	27
V.6 Bioética. ....	27
VI. RESULTADOS.....	28

VI.1 Rango de concentraciones tóxicas de la glucosa.....	28
VI.2 Respuesta cognitiva al estímulo visual.....	29
VI.2.1 Tiempo de respuesta.....	29
VI.2.2 Trayectoria de nado.....	30
VI.2.3 Velocidad de nado.....	30
VI.3 Respuesta anatómica.....	31
VI.3.1 Estructura corporal.....	33
VI.3.2 Estructura craneal.....	34
VI.3.3 Área ocular.....	36
VI.3.4 Arquitectura de la microvasculatura ocular. ....	37
VI. 4 Correlación entre las respuestas morfológicas y funcionales.....	40
VII. DISCUSIÓN.....	42
VIII. CONCLUSIONES.....	49
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Molécula de glucosa.....	5
---	---

<b>Figura 2.</b> Dimorfismo sexual del pez cebra .....	8
<b>Figura 3.</b> Estadios de desarrollo del pez cebra.....	9
<b>Figura 4.</b> Arquitectura microvascular del humano y del pez cebra.. .....	12
<b>Figura 5.</b> Sistema de mantenimiento y reproducción de pez cebra .....	17
<b>Figura 6.</b> Esquema de trabajo para el análisis funcional.....	21
<b>Figura 7.</b> Análisis para determinar la distancia recorrida. ....	22
<b>Figura 8.</b> Esquema del protocolo a seguir para el análisis morfo-anatómico.....	24
<b>Figura 9.</b> Esquema de las mediciones de la región craneal larvaria .....	25
<b>Figura 10.</b> Esquema de la biometría vascular cuantitativa. ....	26
<b>Figura 11.</b> Curva concentración- respuesta de glucosa.) .....	28
<b>Figura 12.</b> Tiempo de respuesta vs concentración.. .....	29
<b>Figura 13.</b> Trayectoria de nado de los grupos larvarios durante el tiempo de registro. ....	30
<b>Figura 14.</b> Velocidad vs concentración. ....	31
<b>Figura 15.</b> Registro fotográfico de larvas pertenecientes a cada uno de los grupos larvarios utilizados en los bioensayos de toxicidad aguda. ....	33
<b>Figura 16.</b> Longitud corporal vs concentración.).....	34
<b>Figura 17.</b> Distancia entre cartílagos craneales vs concentraciones de glucosa.....	35
<b>Figura 18.</b> Angulación entre cartílagos craneales vs concentraciones de glucosa.. .....	36
<b>Figura 19.</b> Área ocular vs concentración.....	37
<b>Figura 20.</b> Registro morfológico de la microvasculatura ocular de larvas de pez cebra. ....	38
<b>Figura 21.</b> Número de vasos hialoideos vs concentraciones de glucosa. ....	39
<b>Figura 22.</b> Correlación entre la destrucción de la microvasculatura ocular vs el aumento del tiempo de respuesta a un estímulo .....	40
<b>Figura 23.</b> Destrucción de la microvasculatura ocular vs Reducción en la distancia de nado.....	41

**Figura 24.** Esquema comparativo entre diferentes compuestos tóxicos y la glucosa según las respuestas morfológicas y funcionales en larvas de pez cebra ..... 47

### **LISTA DE ABREVIATURAS**

**ACR:** Acrilamida

**CH:** Cartílago Ceratohial

**CL<sub>50</sub>:** Concentración letal cincuenta

**CNI:** Capa nuclear interna

**CPI:** Capa plexiforme interior

**CT:** Concentraciones tóxicas

**CT<sub>25</sub>:** Concentración tóxica de 25 mg/mL

**CT<sub>30</sub>:** Concentración tóxica de 30 mg/mL

**CT<sub>45</sub>:** Concentración tóxica de 25 mg/mL

**dpf:** Días post fertilización

**M:** Cartílago de Meckel

**mg/mL:** Miligramos por mililitro

**NAD:** Nicotinamida adenina  
dinucleótido

**NAMPT:** Nicotinamida  
fosforibosiltransferasa

**P:** Cartílago palatoc cuadrado.

**VEGF:** Vascular endothelial growth  
factor.

## RESUMEN

La glucosa es un carbohidrato esencial para el organismo, sin embargo, su toxicidad ha sido poco explotada experimentalmente. En el presente trabajo se analizó el daño inducido por la glucosa a nivel de la morfo funcionalidad retinal en el modelo larvario de pez cebra de 5 días post fertilización (dpf). Se estimó un rango de concentraciones tóxicas (CT) de glucosa, y se evaluó a nivel morfológico la microvasculatura retinal y a nivel funcional la respuesta cognitiva a través del comportamiento locomotor y velocidad de nado bajo estímulo lumínico; todos estos parámetros contrastando grupos controles y tratados. El rango de CT de glucosa fue de 25, 30 y 45 mg/mL. Se obtuvo una reducción entre el 20% y 60% en el área del globo ocular con pérdida de más del 90% de vasos hialoides, así como una reducción superior al 60% de la angulación, curvatura, longitud y distancia euclidiana. Se registró un aumento significativo entre 100% y 600% en el tiempo de respuesta al estímulo lumínico así como una disminución entre el 49% y 92% en la velocidad de nado. Estos hallazgos permitieron caracterizar el daño inducido por la acción tóxica de la glucosa a través de la respuesta cognitiva y el daño retinal en el modelo larvario de pez cebra de 5 dpf, permitiendo visualizar así un vínculo entre la respuesta cognitiva y la estructura anatómica contribuyendo por tanto a la certificación del modelo larvario de pez cebra como eficiente en los estudios de la toxicidad aguda de la glucosa.

Palabras clave: glucosa, toxicidad, pez cebra, respuesta cognitiva, microvasculatura ocular

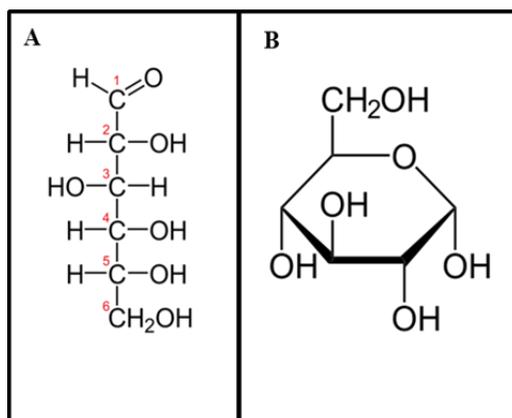
# I. INTRODUCCIÓN

## I.1 Planteamiento del problema

El presente trabajo forma parte de las líneas de investigación que se vienen desarrollando en el *Laboratorio de Microscopia* del Instituto Anatómico “José Izquierdo” de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela, cuyo objetivo general es contribuir al conocimiento de la etiología de distintas patologías que afectan la calidad de vida en el humano. Para ello, el someter modelos animales de experimentación a la acción de agentes químicos, físicos y/o biológicos, catalogados como factores de riesgo para la salud en general, ha resultado de gran valor científico. En el laboratorio han sido evaluados agentes químicos de riesgo neurotóxico como la acrilamida (ACR) y agentes de riesgo hematotóxico como el flúor y el ozono (Álvarez, y col, 2017a, Álvarez, y col, 2017b, Álvarez, y col, 2017c). En esta oportunidad como factor de riesgo se introduce el uso de la glucosa, un carbohidrato esencial para el organismo cuyo consumo indiscriminado promueve la aparición de patologías como la conocida retinopatía, condición esta que ha permitido definir la denominada toxicidad de la glucosa; problemática poco explotada experimentalmente. En tal sentido, considerar los parámetros toxicológicos vinculados a la toxicidad de la glucosa resulta prioritario para los estudios experimentales que abordan la etiología de trastornos como la patología diabética considerada a nivel clínico como un verdadero problema de salud pública (Campos, 2012).

## I.2 Glucosa

La glucosa, un carbohidrato esencial para el organismo, ha sido categorizada conjuntamente con los lípidos, como uno de los principales combustible para el metabolismo celular. Esta puede encontrarse en dos formas, una de estructura lineal, reducida e inestable (Fig. 1A), en donde el grupo carbonilo se encuentra expuesto en el extremo carbono uno terminal. Esta característica le confiere una alta reactividad hacia los grupos aminos primarios de las proteínas, generando en ellas modificaciones estructurales y por tanto alteraciones en la funcionalidad de las biomoléculas (González y col, 2000). Una segunda de forma hexagonal, cíclica y de mayor estabilidad, producto de la reacción entre el grupo aldehído del carbono uno terminal y el grupo hidroxilo del carbono cinco (Fig. 1B) (Devlin, 2004). Cabe destacar que ambas formas, estable e inestable, se encuentran a disposición y en equilibrio en los organismos; equilibrio este que se ve alterado en ciertas patologías como la diabetes, promovida por una elevada concentración de la glucosa o condición de hiperglicemia y con la consecuente aparición de señales de acción tóxica como en la retinopatía.



**Figura 1. Molécula de glucosa.** A. Aldosa, estructura lineal. B. Hemiacetal, estructura cíclica. Tomada y modificada de Devlin, 2004

### **I.3 Hiperglicemia y toxicidad de la glucosa**

La hiperglicemia, término médico asignado a los altos niveles de glucosa en sangre, es uno de los signos principales en el diagnóstico de la denominada condición diabética (Gleeson y col, 2007; Capiotti y col, 2014; Jung y col, 2016), que de acuerdo a la Asociación Americana de Diabetes, clínicamente es considerada cuando el nivel de glucosa en sangre para un individuo se encuentra alrededor de 7 mM, sobrepasando la concentración de 5 mM de un individuo sano (Giri y col, 2018). Dicha condición se encuentra asociada a su vez con efectos tóxicos a distintos niveles (Campos, 2012; Giri y col, 2018). A un primer nivel, en cuanto a las alteraciones cerebrales, que incluyen disfunciones cerebrovasculares, así como efectos perjudiciales sobre la cognición, la transmisión sináptica y la plasticidad neural. (Banner y col, 2015; Huang y col, 2017; Malone, 2016). Además, ha sido reportado que algunas afecciones psiquiátricas, como la depresión y la ansiedad, son altamente prevalentes en la condición diabética (Moulton y col, 2015; Purewal y Fisher, 2018). Esta asociación es bidireccional, donde las complicaciones diabéticas pueden provocar síntomas de ansiedad / depresión, así como estos trastornos cognitivos pueden aumentar el riesgo de aparición de la condición diabética (Gambeta y col, 2016; Vancampfort y col, 2015). Sin embargo, los mecanismos subyacentes involucrados en la relación entre la toxicidad de la glucosa, en la condición de hiperglicemia, y el trastorno cognitivo aún no se conocen bien. Por otra parte, el segundo nivel consiste en el efecto tóxico de la glucosa sobre distintos órganos, tejidos y tipos celulares (Campos, 2012; Giri y col, 2018). Así, en una condición diabética altamente revisada en la literatura como es la diabetes mellitus (DM) tipo 2, ha sido reportada la disfuncionalidad de las células  $\beta$  del páncreas, órgano regulador de la producción de insulina, caracterizada por cambios en la sensibilidad de los receptores de

esta hormona a nivel de los tejidos periféricos. Por otra parte, las células endoteliales capilares de la retina expuestas a condiciones de elevada concentración de glucosa, traen como consecuencia la denominada retinopatía diabética, generando alteraciones tales como microaneurismas, anomalías microvasculares, degeneración de la retina, neovascularización retiniana, hemorragia retiniana y vítrea, desprendimiento de retina traccional, e incluso la destrucción de los vasos sanguíneos (Robinson y col, 2012). En conjunto estas anomalías causan como resultado final, la pérdida parcial o total de la visión (Stehouwer, 2018). De lo antes expuesto resulta evidente que dentro de una condición de elevada concentración de glucosa y toxicidad de la misma, se destacan dos niveles relevantes de trastorno: el nivel conductual o cognitivo y el nivel anatómico, tisular y celular. Sin embargo, hasta donde se conoce, aún, la vinculación entre ambos niveles no ha sido claramente establecida. En este sentido, el uso de modelos animales de experimentación, podría contribuir con tal conocimiento, particularmente indagar sobre la toxicidad de la glucosa tanto a nivel conductual como a nivel morfológico tisular y celular (Mantilla, 2001; Giri y col, 2018).

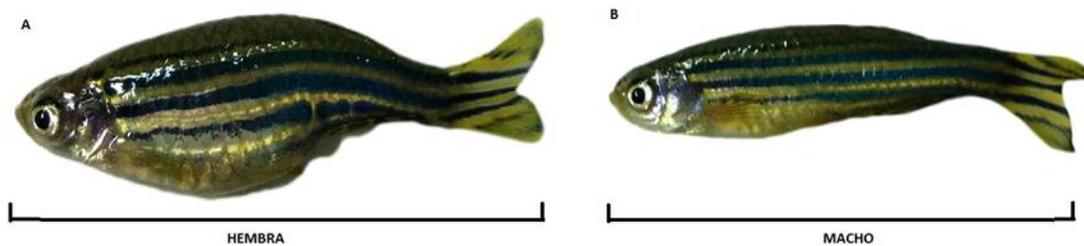
#### **I.4 Modelo experimental**

Hasta la fecha, varias especies animales, incluidos ratones, ratas, gatos, perros, cerdos y primates no humanos, se han utilizado como modelos para proporcionar información valiosa sobre los aspectos tisulares, celulares y moleculares de diversas patologías (Robinson y col, 2012). Cabe destacar que entre los modelos más comúnmente utilizados en las investigaciones son los roedores pertenecientes a los géneros *Rattus* y *Mus* (Feit-Leichman y col, 2005). Sin embargo, los altos costos, la escasez de reactivos, los parámetros bioéticos y la gran cantidad de tiempo invertido en el mantenimiento de estos

modelos clásicos, han generado la búsqueda de otros modelos de experimentación que permitan mejorar y establecer nuevos parámetros sin desmejorar la calidad de la investigación. En este sentido, cobra relevancia el modelo de pez cebra para la investigación biomédica, el cual viene marcando su pauta desde la década de 1960 gracias al biólogo George Streisinger de la Universidad de Oregón. Sin embargo, es solo hasta la década de los noventa cuando este modelo toma importancia a nivel experimental, debido al descubrimiento de la gran cantidad de similitudes genéticas, celulares, anatómicas y fisiológicas que comparte con los mamíferos (Tanguay, 2018).

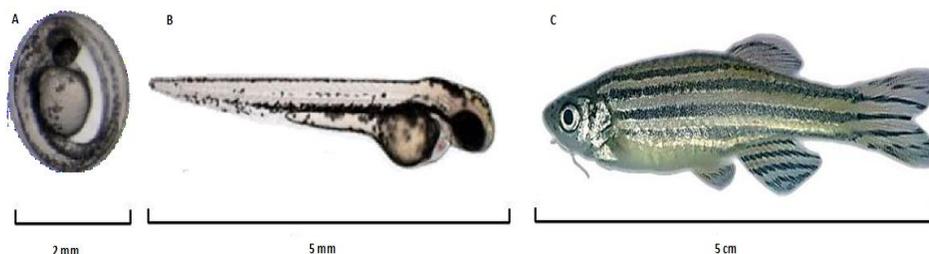
#### **I.4.1 Pez cebra *Danio rerio***

El pez cebra o *Danio rerio* es un pez teleosteo tropical de agua dulce, proveniente del sudeste asiático (India, Bangladesh, Nepal, Myanmar y Pakistán) perteneciente a la familia Cyprinidae. Su característica fenotípica distintiva es un patrón de pigmentación con cinco bandas horizontales en ambos lados del cuerpo que se extienden hasta la aleta caudal. El tamaño máximo alcanzado es de 5 cm en la etapa de adultez y exhibe un evidente dimorfismo sexual. La hembra presenta un abdomen abultado en donde se encuentran almacenados los huevos que son expulsados al momento de la reproducción, los machos son estilizados y de menor tamaño que la hembra (Fig. 2) (Espinosa, 2016; Arias, 2017).



**Figura 2. Dimorfismo sexual en el pez cebra. A. Hembra. B. Macho. Tomada y modificada de Forn-Cuni y col, 2015.**

Resulta relevante la alta progenie obtenida en cada puesta, el desarrollo embrionario extrauterino y la transparencia de los embriones. Estas características permiten un fácil manejo del modelo en el laboratorio, así como también la observación directa de los órganos con el uso de lupas y microscopios (Fig. 3) (Kari y col, 2007).



**Figura 3. Estadios de desarrollo del pez cebra.** A. Embrión de 3 dpf. B. Larva eclosionada de pez cebra con 5 dpf. C. Pez cebra adulto. Tomada y modificada de Arias, 2017.

Este modelo ha sido enmarcado dentro del principio farmacológico de las 3R: el cual consiste en: **reducir** el número de animales necesarios en la experimentación para obtener la información deseada, **refinar** la evaluación de compuestos o sustancias a través de nuevos parámetros fisiológicos, así como podría **reemplazar** o ser un modelo alternativo a modelos experimentales de sistemas complejos como los mamíferos (Guerra y col, 2016; Jung y col, 2016). Gracias a este conjunto de características el pez cebra ha ganado una rápida aceptación como modelo animal de experimentación en numerosas áreas de investigación, principalmente en las áreas de farmacología y toxicología (Fleming y Alderton, 2013).

#### **I.4.1.1 Sistema cognitivo del pez cebra**

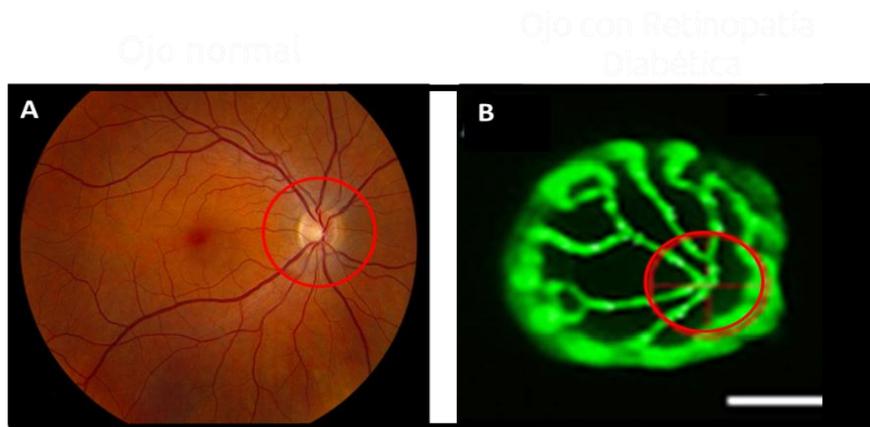
Desde el punto de vista cognitivo el pez cebra ha sido utilizado como un modelo en la neurociencia, ya que posee una variedad de cualidades que lo hacen particularmente útil para el estudio del comportamiento relacionado al estrés y la ansiedad (Kalueff y Cachat, 2011). Entre estas cualidades se encuentra su alta sensibilidad a cambios en su entorno, incluyendo la exposición a depredadores (Stewart y col, 2013) en el cual larvas pez cebra evaden los ataques de peces cebra adultos con respuesta rápidas caracterizadas por giros en forma de C, los cuales le permiten acelerar el cuerpo e iniciar una natación rápida con dirección contraria ha dicho depredador. Así como también, larvas de pez cebra expuestas a feromonas de alarma (Lopez-Luna y col, 2017) presentan una estrategia de evitación de depredadores la cual consiste en disminuir el tiempo y la velocidad de nado. Por otra parte los estímulos visuales permiten obtener información respecto a las respuestas visual-motoras y el sistema visual (MacPhail y col, 2009). En cuanto a la función de dicho sistema en respuesta a los estímulos, las larvas pueden encontrarse en condiciones naturales o expuestas a algún compuesto específico (MacPhail y col, 2009; Schnörr y col, 2009), dependiendo del tipo de investigación que se esté desarrollando. Particularmente los estímulos lumínicos, que consisten en cambios bruscos de luz u oscuridad que estimulan al órgano de la visión o globo ocular, generan una respuesta sobresalto la cual proporciona una medida rápida de la integración sensorial y motora larvaria, a través del periodo en el cual la larva responda a dicho estímulo (Ahmad y col, 2012), esta respuesta se incrementa en el caso de un evento aversivo, como una condición de ansiedad; mientras que disminuye por habituación o en presencia de ciertas drogas (Koch, 1999).

#### **I.4.1.2 Sistema visual del pez cebra**

El sistema visual del pez cebra, particularmente el globo ocular es uno de los órganos de más fácil acceso, por lo cual ha sido utilizado como modelo en las investigaciones relacionadas a alteraciones en la arquitectura tisular, así como en investigaciones vinculadas con las discapacidades visuales ocasionadas por diversas patologías similares a las observadas en humanos (Gleeson y col, 2007). Esto se debe principalmente a la gran cantidad de similitudes tanto en el desarrollo ocular, así como en la composición de estructuras particulares como la retina y la microvasculatura entre el ser humano y el pez cebra (Richardson y col, 2017).

##### **I.4.1.2.1 Microvasculatura ocular del pez cebra**

La microvasculatura ocular del pez cebra se basa en una red de vasos hialoides, los cuales no se degeneran, sino que dan paso a una red vascular retiniana madura confinada a la superficie interna de la retina y el cristalino, similar a otros vertebrados (Kitambi y col, 2009). Por otra parte, la vasculatura ocular de la mayoría de los mamíferos consiste en tres sistemas principales: vasculatura hialoide, vasculatura retiniana y vasculatura coroidea. En primer lugar se forma la vasculatura hialoide, la cual es posteriormente reemplazada por la vasculatura retiniana, dando como resultado un sistema vascular maduro constituido por dos redes de vasos sanguíneos separadas: la vasculatura retiniana y la coroidea. Aun con estas diferencias, es posible relacionar la microvasculatura retiniana del ser humano y el pez cebra a través de la presencia de pericitos y de la disposición de la red de vasos sanguíneos de la vasculatura retiniana (Fig. 4) (Álvarez y col, 2007).



**Figura 4. Arquitectura microvascular del humano y del pez cebra. A.** Estructura microvascular del ser humano. **B.** Estructura microvascular del pez cebra. Se destaca en rojo el nervio óptico central. Tomada y modificada de Andonegui y col. 2013; Hashiura y col., 2017.

## II. ANTECEDENTES

La toxicidad de la glucosa generada a elevadas concentraciones o de manera crónica en una condición de hiperglicemia podría ser entendida como el daño generado por este carbohidrato a nivel cognitivo y a nivel estructural, particularmente blancos tisulares y celulares específicos (Robertson y col, 2003). Desde el punto de vista cognitivo, la conducta normal del modelo larvario de pez cebra ha sido caracterizada por una elevada actividad motora, incluyendo un variado repertorio de patrones motores que se pueden clasificar en giros y forma de nado. Los giros se caracterizan por ser: de escape rápido, típico de las respuestas de escape, es un giro con impulso acompañado de un posterior un nado rápido (Budick y O'Malley, 2000); de rutina; son lentos y carecen de la sacudida que a menudo acompaña a los giros de escape (Burgess y Granato, 2007); giros en J, consisten en múltiples contracciones unilaterales a un lado del cuerpo alterando lenta y moderadamente la orientación de la larva (McElligott y O'Malley, 2005). En cuanto a la conducta de nado, esta se caracteriza por ser: en ráfaga, nado rápido con flexiones de mayor amplitud (Gahtan y col., 2005) y de captura, formada por componentes locomotores más simples como giros de rutina y movimientos lentos (Borla y col, 2002). En distintas condiciones experimentales, como la exposición a compuestos de distinta naturaleza incluyendo la glucosa (Jin y col, 2016; Rahma y col, 2017) han sido reportadas alteraciones de estas características. Un ejemplo de ello se observa en larvas expuestas a fungicidas (Andrade y col, 2016) las cuales disminuyen la velocidad de nado con ausencia de patrones de giros de movimiento rápido. Otra condición experimental es la prueba de luz/oscuridad, en las cuales el comportamiento larvario es caracterizado por un escape rápido o respuesta sobresalto asociada a la evasión de una potencial amenaza (Issa y col, 2011); esta respuesta

puede verse alterada o no al exponer dichas larvas a compuestos como la cocaína y el etanol (Irons y col, 2010). Desde el punto de vista estructural la arquitectura microvascular ocular normal se encuentra caracterizada por una red de finos vasos hialoides primarios y secundarios dispuestos en forma de red alrededor de todo el globo ocular (Gestri y col, 2012). En una condición de hiperglicemia o de elevada concentración de glucosa ocurre un engrosamiento significativo de los vasos sanguíneos retinianos, así como un aumento en la fragilidad de los mismos (Jung y col, 2016). Estos antecedentes referidos a cambios cuantificables en el comportamiento y en la estructura permiten entonces seleccionar al modelo experimental larvario de pez cebra, como eficiente para abordar la posible relación entre la respuesta cognitiva y los cambios estructurales vinculados con el trastorno que genera la toxicidad de la glucosa.

### **III. HIPÓTESIS**

Si se induce un daño retinal bajo distintas concentraciones tóxicas de glucosa en el modelo larvario de pez cebra, entonces el tiempo de respuesta a un estímulo lumínico, la velocidad y la trayectoria de nado, así como la estructura corporal, la estructura cráneo facial, el área y la microvasculatura ocular del mismo se vería alterada.

## **IV. OBJETIVOS**

### **IV.1. Objetivo General**

Analizar las características del daño morfo-funcional retinal generado por la toxicidad de la glucosa en el modelo larvario de pez cebra.

### **IV.2. Objetivos Específicos**

**IV.2.1.** Estimar el rango de concentraciones tóxicas de la glucosa en el modelo larvario de pez cebra.

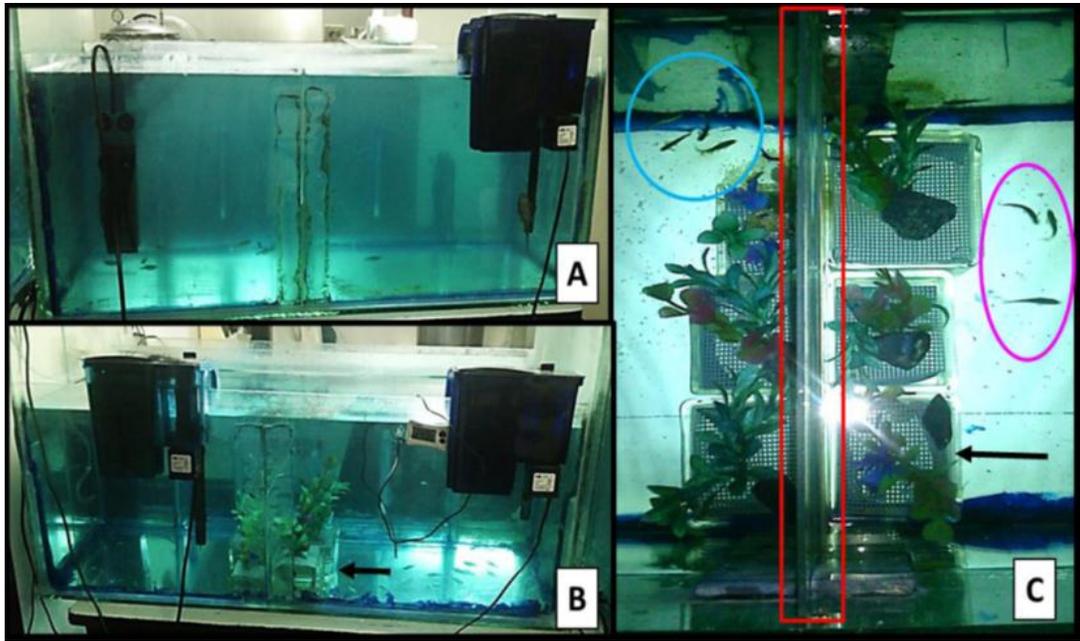
**IV.2.2.** Describir el comportamiento locomotor larvario en respuesta a un estímulo lumínico bajo la condición de toxicidad generada por el rango de concentraciones tóxicas de la glucosa.

**IV.2.3** Describir la anatomía de la estructura corporal y craneal larvaria, así como la microvasculatura del globo ocular bajo una condición tóxica generada por el rango de concentraciones tóxicas de la glucosa.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### V.1 Manejo y mantenimiento del modelo animal experimental *Danio rerio* adulto bajo condiciones de laboratorio.

Peces adultos, hembras y machos, fueron adquiridos en la tienda de mascotas Tropiacuarium, ubicada en la urbanización el cafetal, estado Miranda,. Para el mantenimiento y obtención del modelo larvario, se utilizaron dos acuarios de vidrio, ambos con una capacidad de 120 litros de agua, surtidos con filtros con carbón activado en su interior y una salida de aire para la filtración mecánica del agua (Rocha y col., 2002). Cada acuario presentó un uso definido; uno para la alimentación y descanso, y el otro para la puesta y recolección de huevos embrionados, este último denominado "paridera" (Fig. 5). Cada 15 días los acuarios fueron sometidos a mantenimiento con limpieza de paredes internas, filtros y recambio de agua limpia, filtrada, declorada y descontaminada con anticloro y azul de metileno marca KANTAL S.A, Para la obtención de huevos fertilizados y larvas, se establecieron dos grupos de peces. Cada uno de ellos estuvo compuesto por hembras y machos con una proporción 2:1 respectivamente. Un grupo fue colocado en el acuario "paridera" y el grupo restante se mantuvo en el acuario de alimentación y descanso. Cada día estos grupos fueron intercambiados una vez realizada la recolección de huevos. La alimentación consistió en una dieta rica en proteínas a través de comida seca para peces de acuario marca KANTAL S.A.



**Figura 5. Sistema de mantenimiento y reproducción de pez cebra.** A. Acuario de alimentación. B. Acuario de puesta y recolección de huevos embrionados. C. Características internas del acuario de puesta y recolección de huevos embrionados, se destaca lámina de plástico para la separación de los peces (rectángulo), grupo de peces machos (círculo) y hembras (óvalo) y los contenedores (flechas). Tomada de Arias, 2017.

### V.1.2 Puesta, obtención y limpieza de huevos fertilizados

El grupo de peces que se colocó en el acuario de reproducción “paridera” fueron separados en hembras y machos por una lámina de plástico con la finalidad de activar el cortejo al ser removida a tempranas horas del día, cumpliendo el ciclo 12 horas de luz, 12 horas de oscuridad. Se colocaron en el centro del acuario 6 recipientes medianos de vidrio que contenían pequeñas plantas artificiales como estimulantes para el desove y una malla de plástico para evitar el canibalismo. Una vez ocurrido el desove y la fertilización, los recipientes fueron retirados de la pecera y se procedió a la recolección de los huevos a través de un proceso de filtración mecánica con un tamiz metálico pequeño. Los huevos

obtenidos se transfirieron a una cápsula de Petri para facilitar los procesos de observación, selección, cuantificación y limpieza que se realizaron bajo el microscopio estereoscópico. Posteriormente fueron transferidos a otra cápsula de Petri que contenía agua de pecera.

### **V.1.3 Selección de embriones**

Los embriones obtenidos de los peces cebra fueron incubados durante cinco días a temperatura ambiente. De manera interdiaria los embriones no viables se extrajeron y los embriones viables se transfirieron a una nueva cápsula de Petri con agua de pecera, esto se realizó para mantener elevada la viabilidad de los embriones. Transcurrido este periodo se procedió a la clasificación del estadio de desarrollo larvario correspondiente en términos de días post-fertilización (Kimmel y col, 1995). Las larvas fueron seleccionadas de 5 dpf para posteriormente ser utilizadas en bioensayos toxicológicos *in vivo*.

## **V.2. Estimación del rango de CT de la glucosa**

Para determinar el rango de concentraciones tóxicas de la glucosa, se tomó como punto de referencia la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) y el intervalo de confianza al 95%. Dichos valores permitieron establecer a partir de la mortalidad larvaria las concentraciones a las cuales la glucosa generó señales tóxicas.

La CL<sub>50</sub> es la concentración a la cual una sustancia genera la muerte del 50% de la población de los animales de experimentación expuestos a ella (Gamez y Ramírez, 2008). Para la estimación de la CL<sub>50</sub>, fue necesaria la preparación de una solución stock de glucosa a una concentración de 50 mg/mL. Esta fue almacenada a una temperatura de 4° C hasta

ser utilizada. Posteriormente, se realizaron bioensayos de toxicidad aguda *in vivo* de flujo continuo con renovación interdiaria del medio en placas de 24 pocillos con una duración de 72 horas de tratamiento. En cada pocillo se colocaron 5 larvas con 5 dpf en concentraciones ascendentes de glucosa; 10 mg/mL, 20 mg/mL, 30 mg/mL, 40 mg/mL y 50 mg/mL con sus respectivos controles y por triplicado según el protocolo ZeGlobalTox (Cornet y col, 2017). Para ello se realizaron una serie de diluciones a partir de la solución stock de glucosa ya previamente preparada. Cada dilución fue añadida a un pocillo de una placa de 24 pocillos hasta alcanzar un volumen final de 1 mL. Los controles consistieron en 1 mL de agua de pecera filtrada.

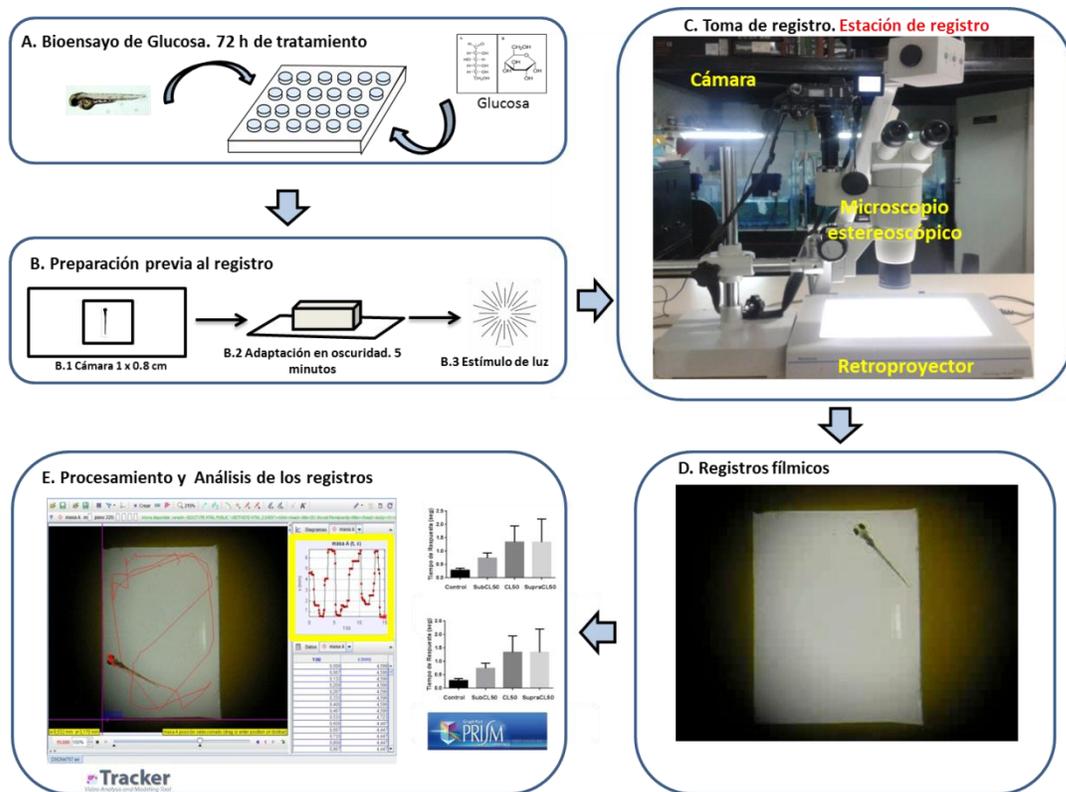
Al finalizar el tratamiento se verificó la mortalidad larvaria para cada concentración a través de la ausencia de la actividad cardíaca.

### **V.3 Parámetros de análisis funcional**

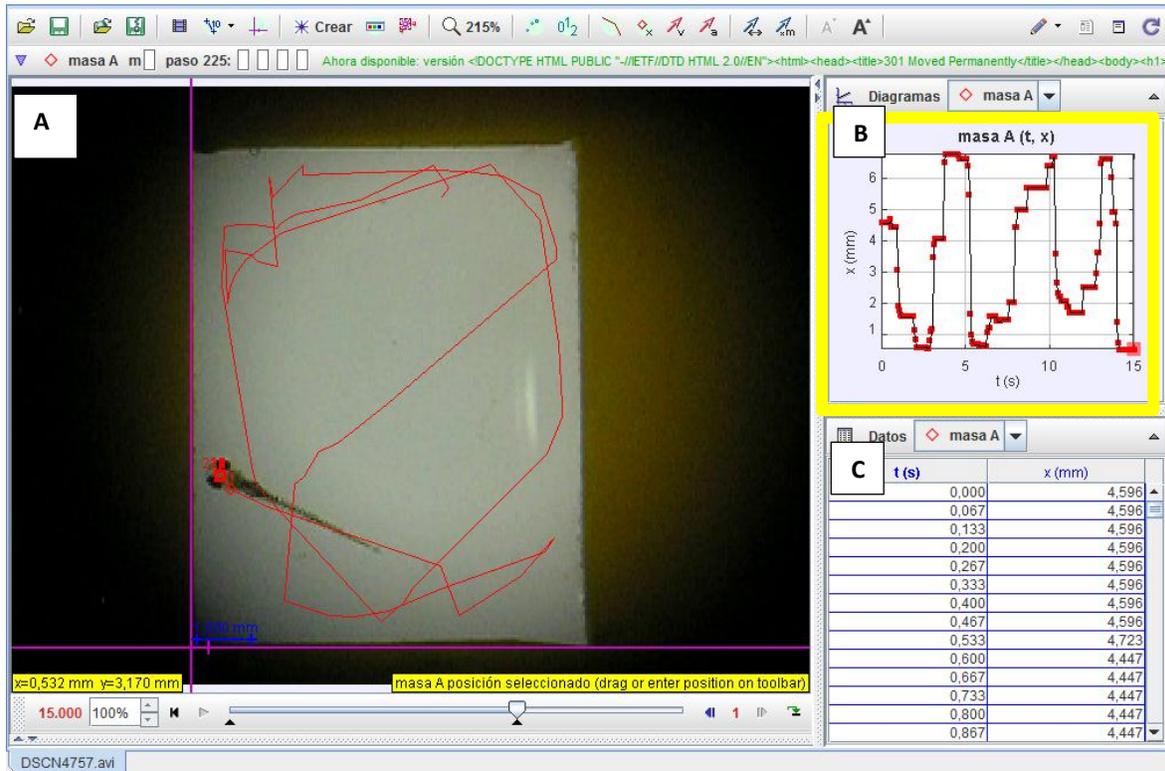
#### **V.3.1 Ensayos de respuesta motora a un estímulo lumínico**

Para este ensayo, se realizaron bioensayos agudos *in vivo* de flujo continuo con renovación interdiaria del medio en placas de 24 pocillos con una duración de 72 horas de tratamiento. Cada pocillo contenía 1mL de las CT de la glucosa, en los cuales fueron inmersas 5 larvas con 5 dpf; con sus respectivos controles y réplicas según el protocolo ZeGlobalTox (Cornet y col, 2017). Posteriormente se construyó una estación de trabajo para la ejecución de este bioensayo, la cual consistió en un microscopio estereoscópico SMZ800 Nikon con un aumento de 1.5x, una cámara de video Nikon E8400, un retroproyector Panasonic Video Imager WE-MV 180A y una cámara de 1 x 0.8 cm construida sobre un portaobjetos, allí

fueron colocadas de manera individual las larvas pertenecientes a cada uno de los grupos con la menor cantidad de medio posible, para ser aclimatadas en oscuridad durante 5 minutos colocando sobre ella una pequeña tapa de aluminio oscura. Transcurrido ese periodo se sometió a la misma a un estímulo de luz emitido por la base del retroproyector, registrándose con la cámara y el microscopio estereoscópico con un aumento de 1.5 X y durante 15 segundos los siguientes parámetros: tiempo de respuesta al estímulo, la distancia recorrida y la velocidad recorrida posterior al estímulo (Cassar y col, 2018). El esquema general se encuentra representado en la Fig.6.



**Figura 6. Esquema de trabajo para el análisis funcional.** **A.** Exposición de larvas de 5 dpf a las concentraciones de glucosa estimadas durante 72 horas. **B.** De manera individual las larvas son colocadas en la cámara de 1 x 0.8cm y aclimatadas en oscuridad durante 5min, posteriormente se someten a un estímulo de luz. **C.** El paso anterior y la toma de registro son realizados en la estación de registro que consta de una cámara, un retroproyector y un microscopio estereoscópico. **D.** Registro fílmico el cual posteriormente es llevado a un ordenador o computadora. **E.** Análisis de los registros fílmicos con los programas video tracker y Graph Pad Prism 6.



**Figura 7. Análisis para determinar la distancia recorrida.** A. Se muestra la imagen del video registro, el eje de referencia, barra de calibración del programa, así como también se destaca en rojo la trayectoria recorrida por la larva durante los 15 segundos de registro. B Se muestra encerrado por el recuadro amarillo la curva distancia vs tiempo. C Se muestra la ventana con los datos de tiempo y distancia recorrida por la larva del programa video-tracker que permitió el análisis de la distancia recorrida por la larva luego del estímulo. Fuente propia.

Para el cálculo de la velocidad alcanzada en los 15 segundos de registro, se calculó la distancia total recorrida con las siguientes fórmulas matemáticas:

$$V_{(15seg)} = \frac{D_t}{15seg} \quad (1)$$

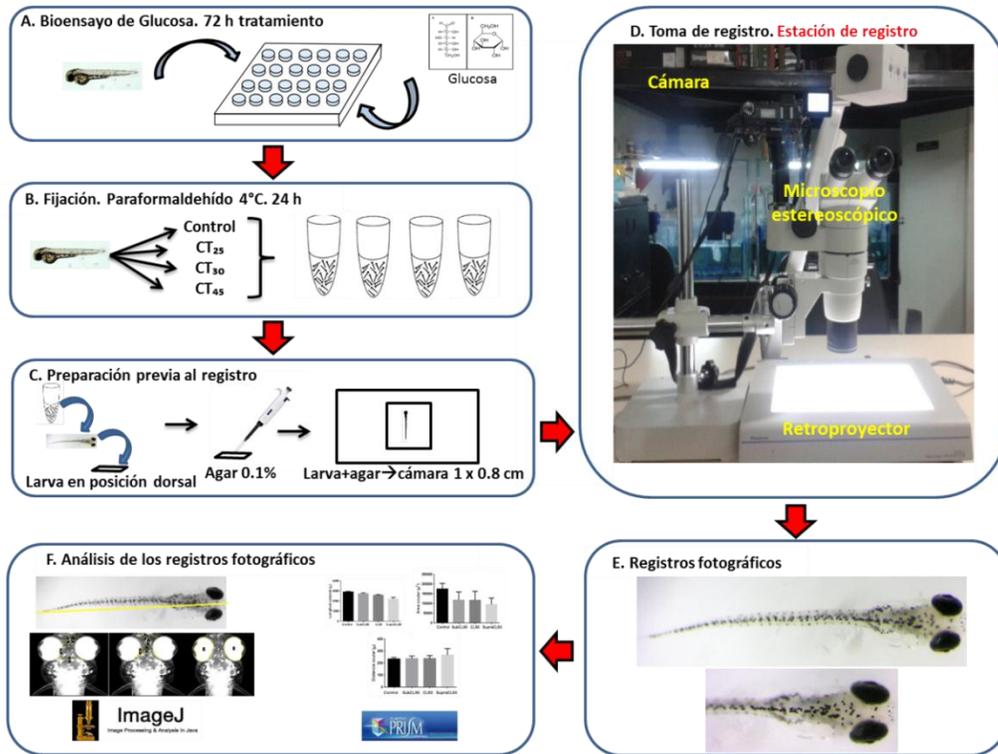
$$D_t = d_a + d_b + d_c + \dots d_n \quad (2)$$

$$d_n = |x_f - x_i| \quad (3)$$

Donde  $D$  es la distancia total recorrida por la larva y se calcula sumando las distancias recorridas en cada uno de los intervalos  $d$ , el cual se calcula restando el punto final  $x_f$  del punto inicial  $x_i$

#### **V.4 Parámetros de análisis morfológico.**

Como se indica en la Figura 8, una vez finalizadas las 72 horas de tratamiento y realizados los registros fílmicos, las larvas se fijaron en paraformaldehído 4% durante 24 horas a una temperatura de 4°C en microtubos previamente identificados con el indicador toxicológico respectivo y el control. Transcurrido este periodo, en la misma estación donde se realizaron los registros fílmicos también se ejecutaron los registros fotográficos. En esta oportunidad fue necesario preparar 20 mL de agar sigma al 0.1% y añadir una gota del mismo luego de colocar a las larvas de manera individual en la cámara de 1 x 0.8 cm, de esta manera se mantuvieron fijas en posición dorsal, permitiendo un registro óptimo. Posteriormente fueron realizados los registros fotográficos a distintos aumentos, de 1.5 x para la morfometría corporal y de 5 x para la morfometría craneal.



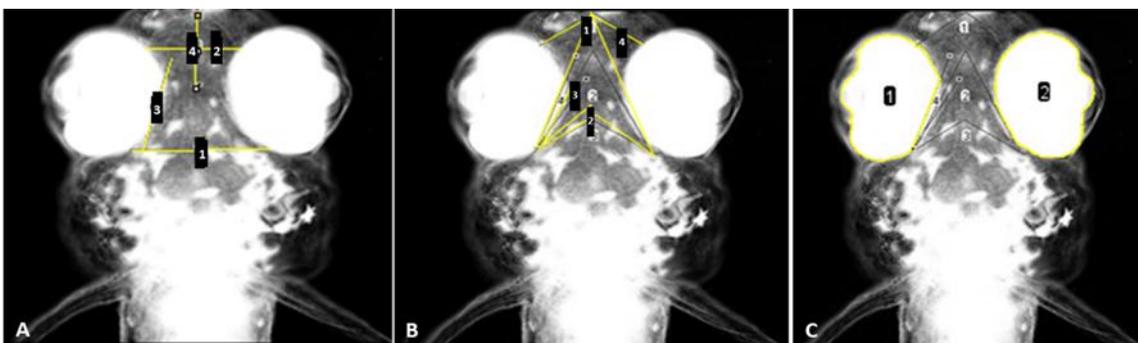
**Figura 8. Esquema del protocolo a seguir para el análisis morfo-anatómico.** **A.** Exposición de larvas de 5 dpf a las concentraciones de glucosa estimadas: CT<sub>25</sub>, CT<sub>30</sub> y CT<sub>45</sub> durante 72 horas. **B.** Las larvas don fijadas durante 24 horas en paraformaldehído. **C.** De manera individual las larvas son colocadas en posición dorsal en la cámara de 1 x 0.8cm y se le añade una gota de agar al 0.1% para mantenerla fija. **D.** La cámara es colocada en la estación de registro. **E.** Registro fotográfico el cual posteriormente es llevado a un ordenador o computadora. **F.** Análisis de los registros fotográficos con los programas ImageJ y Graph Pad Prism 6.0

### V.4.1 Morfometría Corporal

Para el análisis morfométrico corporal, fue medida la distancia entre la boca de la larva y la punta de la aleta caudal. Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el programa de análisis de imagen ImageJ (Rueden y col, 2017).

### V.4.2 Morfometría Craneal

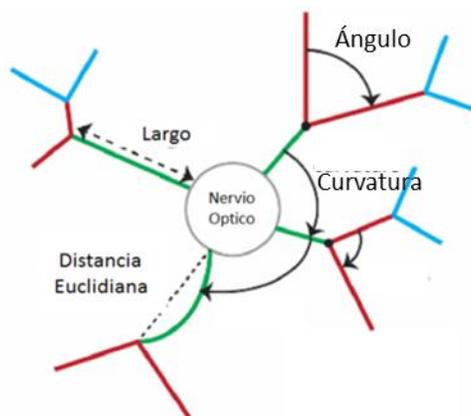
Para el análisis morfométrico craneal, fueron medidas las distancias y ángulos aproximados de los cartílagos presentes en esta región., los cuales incluyen: el cartílago de meckel (M), cartílago palatoc cuadrado (PQ), y el cartílago ceratohial (CH), y las relaciones respectivas entre ellos. En cuanto a las distancias, las relaciones establecidas fueron las siguientes: PQ-PQ, M-M, PQ-M y M-CH (Fig. 9A). Por otra parte, las relaciones establecidas para los ángulos fueron: PQ-M, CH, PQ-CH y M (Fig. 9B). Asimismo, el área de los ojos fue medida ( $\text{mm}^2$ ) (Fig. 9C).



**Figura 9. Esquema de las mediciones de la región craneal larvaria. A** Distancias entre los cartílagos (mm) PQ-PQ (1), M-M, (2), PQ-M (3) y M-CH (4). **B.** Ángulos entre los cartílagos ( $^{\circ}$ ) PQ-M (1), CH (2), PQ-CH (3) y M (4) . **C.** Área ocular ( $\text{mm}^2$ )

### V.4.3. Arquitectura de la microvasculatura ocular

Para el análisis morfológico del globo ocular fue necesaria su separación del resto de la larva. Una vez finalizado el tiempo de tratamiento con el rango de CT de glucosa, las larvas fueron fijadas con paraformaldehído 4% durante 24 horas a una temperatura de 4°C en microtubos previamente identificados con el indicador toxicológico respectivo y el control. Transcurrido este periodo las larvas fijadas fueron llevadas a una placa 6 x 4 pocillos en donde se procedió a realizar tres lavados de una hora cada uno con agua destilada. Posteriormente se sometieron las muestras a un tratamiento con tripsina a una concentración de (Sigma-Aldrich, E.U) a 37°C durante 80 minutos, esto permitió la separación de los tejidos. Se realizaron nuevamente tres lavados de una hora con agua destilada y con fuertes pipeteos ocurrió la disgregación de los globos oculares del resto de la larva. Finalmente, los globos oculares obtenidos fueron observados bajo el microscopio de fluorescencia OLYMPUS (IX71, Tokio, Japón) a una longitud de onda de 375-400 nm, permitiendo la cuantificación de los cambios en la microvasculatura ocular de larvas de pez cebra, donde se evaluaron y compararon los siguientes parámetros: ángulo, largo, curvatura y distancia euclidiana de los vasos hialoides retinianos (Fig. 10) (Bozic y Tao, 2018).



**Figura 10. Esquema de la biometría vascular cuantitativa.** Tomada y modificada de Bozic y Tao, 2018

## **V.5 Análisis de datos**

Todos los registros fílmicos y fotográficos fueron analizados con los programas Tracker Video Analysis and Modeling Tools (Brown, 2019) e ImageJ (Rueden y col, 2017), respectivamente. Por otra parte, todos los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente y posteriormente graficados con el programa GraphPad Prism versión 6.00 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA.

Los análisis estadísticos aplicados fueron los siguientes: método de Spearman – Karber para obtener los valores de  $CL_{50}$  de glucosa y su intervalo de confianza al 95%. Para los parámetros de tiempo de respuesta al estímulo lumínico, velocidad de nado, trayectoria de nado, estructura corporal y área ocular fue aplicado un análisis de varianzas (ANOVA) de una vía. Por último se aplicó un análisis de varianzas (ANOVA) de dos vías para el análisis de la estructura cráneo facial y la microvasculatura ocular.

## **V.6 Bioética.**

Todos los experimentos realizados en este trabajo se llevaron a cabo de acuerdo a las directrices éticas de la Comunidad Europea Directiva del Consejo comunidades del 24 de noviembre de 1986 (86/609/CEE).

## VI. RESULTADOS

### VI.1 Rango de concentraciones tóxicas de la glucosa

El rango de CT estimado para la glucosa quedó expresado en tres concentraciones: 25, 30 y 45 mg/mL. Dichas concentraciones fueron obtenidas a partir de la relación concentración-respuesta en función de la mortalidad representada en una gráfica logaritmo de la concentración vs respuesta (Fig. 11).

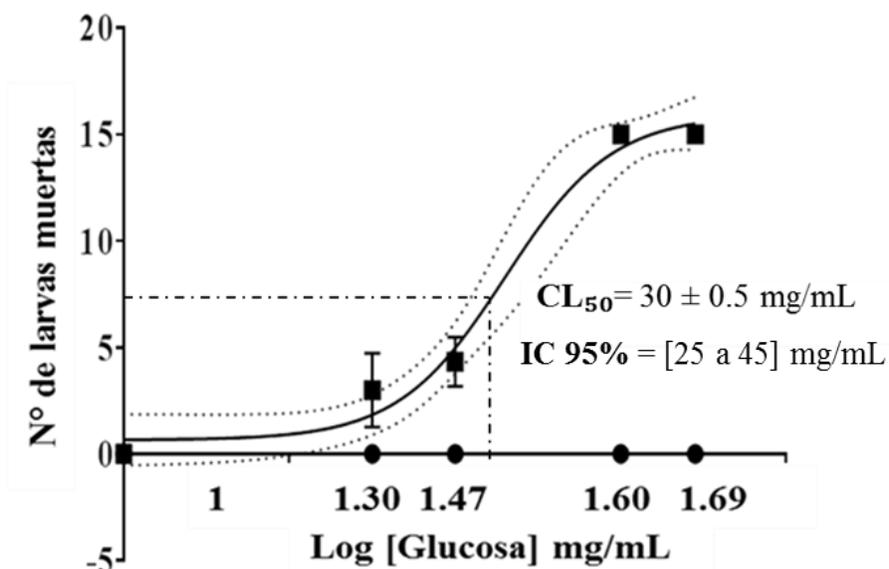
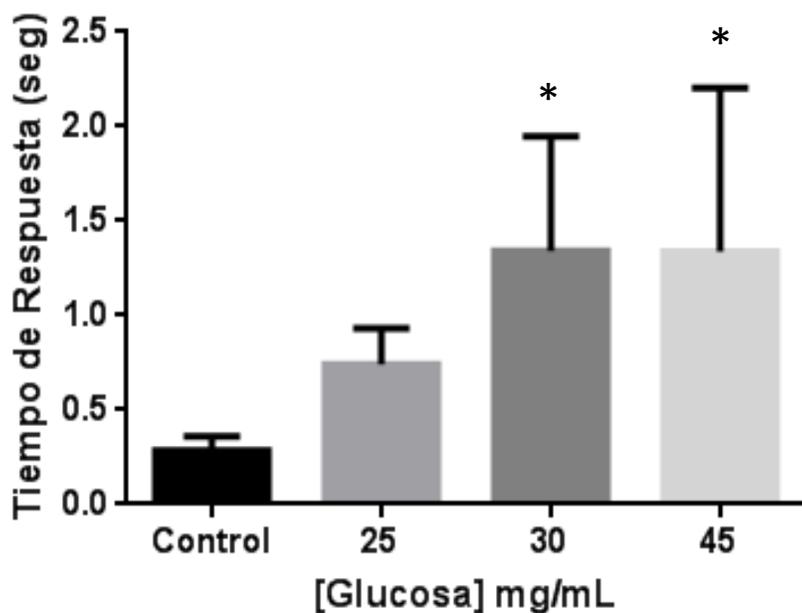


Figura 11. Curva concentración- respuesta de glucosa. Los datos se expresan como el valor promedio y la desviación estándar de 15 larvas por concentración y fueron analizados con el método Spearman- Karber ( $p < 0.05$ )

## VI.2 Respuesta cognitiva al estímulo visual

### VI.2.1 Tiempo de respuesta

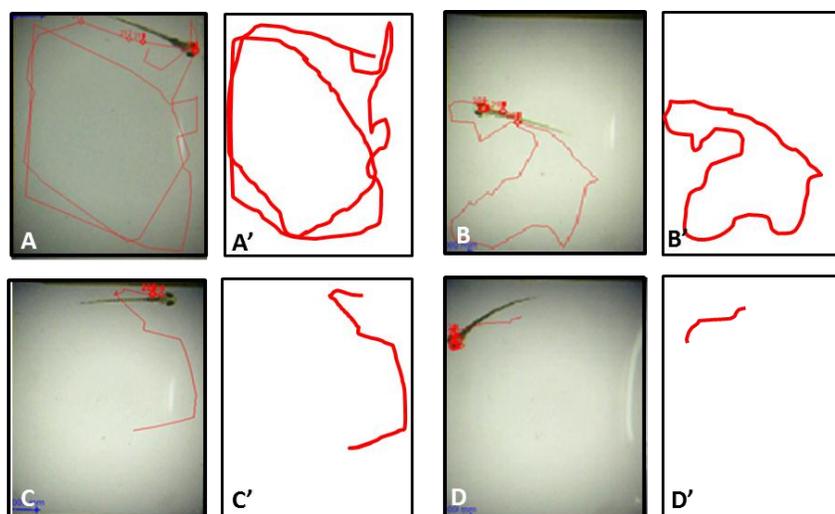
El tiempo de respuesta al estímulo lumínico aplicado, mostró un incremento significativo del 600% en las poblaciones larvarias tratadas con las CT<sub>30</sub> y CT<sub>45</sub> respecto al grupo control, mientras que para el grupo larvario expuesto a la CT<sub>25</sub> el tiempo de respuesta fue similar al del grupo control, como lo muestra la relación entre el tiempo de respuesta en segundos y el rango de las CT de la glucosa (Fig. 12).



**Figura 12. Tiempo de respuesta vs concentración.** . Los datos se expresan como el valor promedio y la desviación estándar de 15 larvas por concentración y fueron analizados con un ANOVA de una vía. Los grupos con asteriscos son estadísticamente diferentes con respecto al control. ( $p < 0.05$ ).

## VI.2.2 Trayectoria de nado

La trayectoria de nado de las larvas control fue registrado como un trazo circular de más de una vuelta completa cercana al borde o pared de la cámara de manera periférica luego del estímulo lumínico, como se resalta en la huella analizada (Fig. 13 A, A'). Las larvas expuestas a la CT<sub>25</sub> (Fig. 13 B, B'), sin embargo luego del estímulo lumínico se registró un menor número de vueltas con pérdida en la orientación periférica. Por otra parte, el registro de la trayectoria de los grupos larvarios expuestos a las CT<sub>30</sub> y CT<sub>45</sub> se observa luego del estímulo lumínico una pérdida del 65% y del 85% respectivamente en el trazado de la trayectoria respecto al control (Fig. 13 C, C' y D, D').

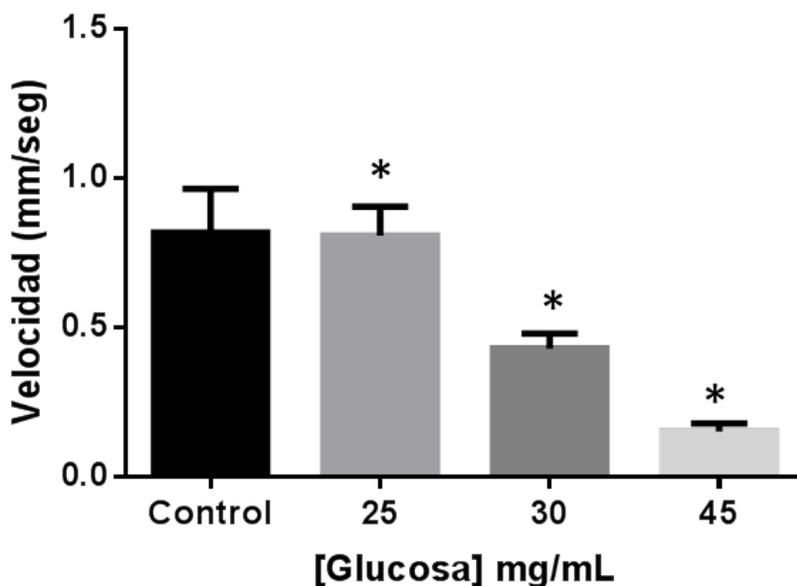


**Figura 13.** Trayectoria de nado de los grupos larvarios durante el tiempo de registro. A, A': Control. B, B': 25 mg/mL. C, C': 30mg/mL. D, D': 45 mg/mL. Duración del registro: 15 segundos.

## VI.2.3 Velocidad de nado

La velocidad de nado luego del estímulo lumínico aplicado, mostró una reducción significativa, a mayor concentración de glucosa menor velocidad de nado con respecto al grupo control. Así cabe destacar que las poblaciones larvarias tratadas con el rango de

concentraciones tóxicas  $CT_{45}$ ,  $CT_{30}$  y  $CT_{25}$  mostraron una reducción del 92%, 73% y 49% respectivamente, como lo muestra la relación entre la velocidad de nado en milímetros por segundo y el rango de las CT de la glucosa (Fig. 14).



**Figura 14. Velocidad vs concentración.** Los datos se expresan como el valor promedio y la desviación estándar de 15 larvas por concentración y fueron analizados con un ANOVA de una vía. Los grupos con asteriscos son estadísticamente diferentes con respecto al control. ( $p < 0.05$ ).

### VI.3 Respuesta anatómica

La respuesta anatómica de las larvas tratadas con el rango de CT de la glucosa fueron determinadas por los cambios generados en dos niveles estructurales: estructura corporal y estructura craneal. En cuanto a las larvas pertenecientes al grupo control, la estructura corporal larvaria no se mostró alterada, así como tampoco se registró anomalías en cuanto a

la estructura craneal y al área superficial ocular (Fig. 15 A). Las larvas expuestas a la CT<sub>25</sub> de glucosa, por el contrario mostraron una pequeña curvatura en la aleta caudal, a nivel de la región craneal, ocurrió una reducción en las distancias y un aumento en los ángulos entre los cartílagos, así como una reducción del área de la superficie ocular, respecto a lo observado en el grupo control (Fig.15 B). El grupo larvario expuesto a la CT<sub>30</sub> también mostró curvatura caudal con reducción de la longitud corporal, así como una pérdida de las distancias, ángulos y área superficial ocular, en comparación al grupo control (Fig. 15 C). Por último las larvas expuestas a la CT<sub>45</sub>, a diferencia del grupo control mostraron una curvatura caudal acentuada, acompañada de una reducción significativa de la longitud corporal. En cuanto a la estructura craneal las distancias y ángulos de los cartílagos presentaron reducciones y el área superficial ocular disminuyó de manera significativa (Fig. 15 D). Cabe destacar que las alteraciones manifestadas en cada uno de los parámetros evaluados fueron proporcionales al incremento en el rango de concentraciones tóxicas de la glucosa, tal como se muestra en el registro fotográfico.

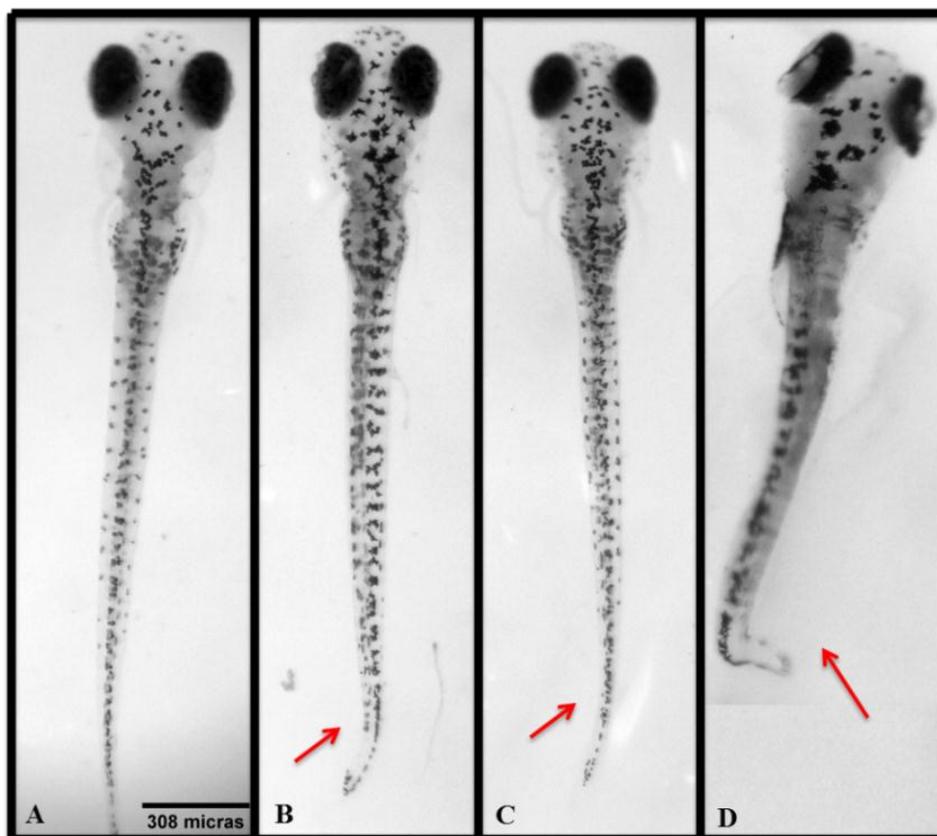
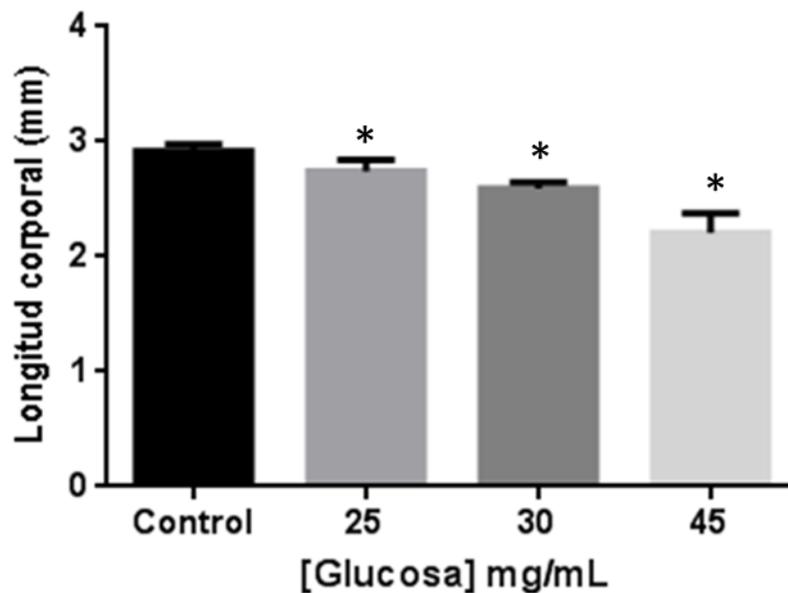


Figura 15. Registro fotográfico de larvas pertenecientes a cada uno de los grupos larvarios utilizados en los bioensayos de toxicidad aguda. A. Control. B. CT<sub>25</sub>. C. CT<sub>30</sub>. D. CT<sub>45</sub>. Las flechas señalan la curvatura caudal.

### VI.3.1 Estructura corporal

Cuantitativamente, la reducción de la longitud corporal en los grupos tratados con el rango de concentraciones tóxicas CT<sub>45</sub>, CT<sub>30</sub> y CT<sub>25</sub> respecto al grupo control fue del 24%, 20% y 18% respectivamente, como lo muestra la representación gráfica de la relación entre la longitud corporal en milímetros y el rango de las CT de la glucosa (Fig. 16).



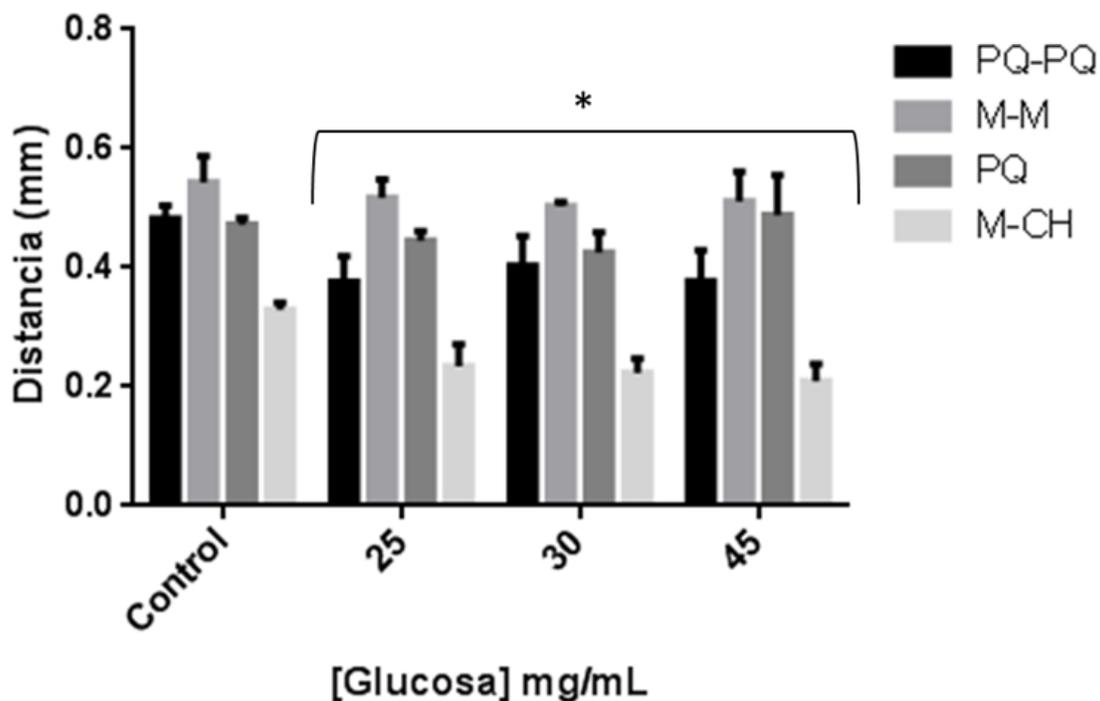
**Figura 16. Longitud corporal vs concentración.** Los datos se expresan como el valor promedio y la desviación estándar de 15 larvas por concentración y fueron analizados con un ANOVA de una vía. Los grupos con asteriscos son estadísticamente diferentes con respecto al control. ( $p < 0.05$ )

## VI.3.2 Estructura craneal

### VI.3.2.1 Distancia entre los cartílagos

En cuanto a la anatomía cráneo facial de la población larvaria, cuantitativamente la distancia entre los cartílagos PQ-PQ presentaron una reducción del 30% 26% y 25%, para las larvas tratadas con las CT<sub>25</sub>, CT<sub>30</sub>, CT<sub>45</sub> respectivamente, respecto al grupo control. Así como la longitud del segmento correspondiente a dicho cartílago se redujo en un 8% y 12% para las larvas tratadas con las CT<sub>25</sub> y CT<sub>30</sub> respectivamente, mientras que para las larvas tratadas con CT<sub>45</sub> aumentó en un 8% en comparación al grupo control. La distancia entre los cartílagos de M disminuyó respecto al grupo control en un 10% en los grupos larvarios expuestos a las concentraciones CT<sub>25</sub> y CT<sub>45</sub>, y en un 15% para las larvas tratadas con la CT<sub>30</sub>. En cuanto a la distancia entre los cartílagos M-CH para las larvas tratadas con las

concentraciones  $CT_{25}$ ,  $CT_{30}$ ,  $CT_{45}$  disminuyó en un 28%, 32% y 36% respectivamente, como lo muestra la representación gráfica de la relación entre la distancia en milímetros y el rango de las CT de la glucosa (Fig. 17).

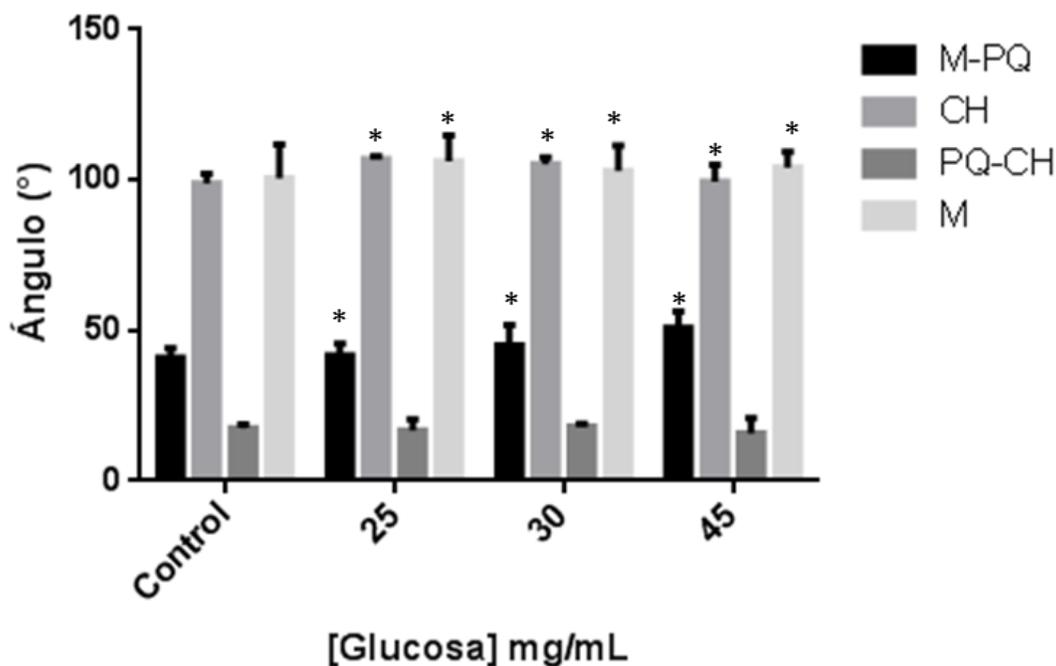


**Figura 17. Distancia entre cartílagos craneales vs concentraciones de glucosa.** Los datos se expresan como el valor promedio y la desviación estándar de 15 larvas por concentración y fueron analizados con un ANOVA de dos vías. Los grupos con asteriscos son estadísticamente diferentes con respecto al control. ( $p < 0.05$ )

### VI.3.2.2 Ángulos entre los cartílagos

El ángulo entre los cartílagos M-PQ aumentó respecto al grupo control en un 11%, 15% y 30% para las larvas expuestas a las  $CT_{25}$ ,  $CT_{30}$ ,  $CT_{45}$  respectivamente. En cuanto al ángulo formado por los cartílagos CH en los grupos larvarios tratados con el rango de glucosa no mostró una diferencia significativa respecto al grupo control. El ángulo que se forma entre los cartílagos PQ-CH disminuyó en un 6%, 4% y 2% para las larvas tratadas con las

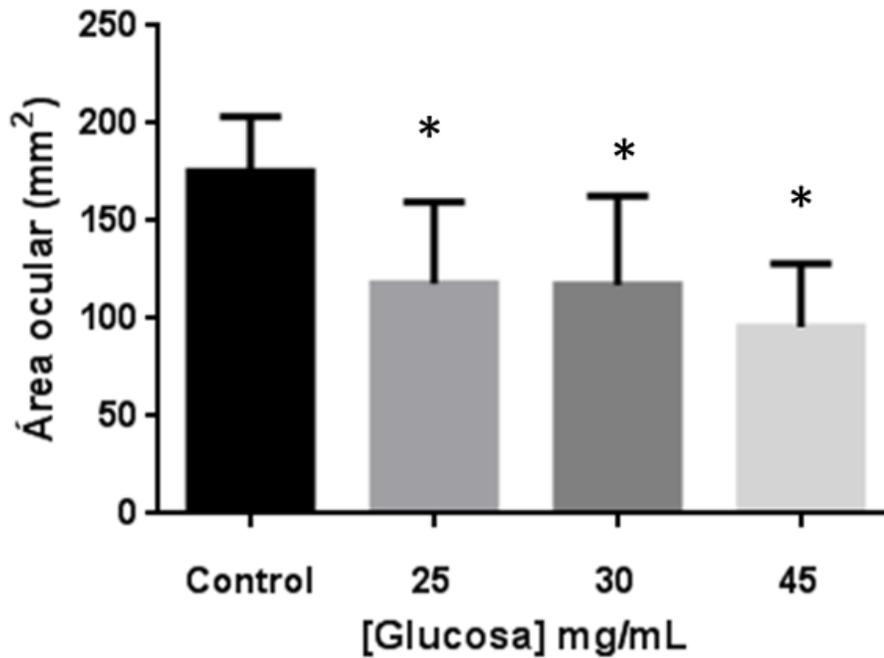
concentraciones CT<sub>25</sub>, CT<sub>30</sub>, CT<sub>45</sub> de glucosa respectivamente, en comparación al grupo control. Finalmente los cartílagos de M presentaron una angulación reducida respecto al grupo control, en un 17%, 20% y 23% con las concentraciones CT<sub>25</sub>, CT<sub>30</sub>, CT<sub>45</sub> de glucosa respectivamente, como se muestra en la Fig. 18.



**Figura 18. Angulación entre cartílagos craneales vs concentraciones de glucosa.** Los datos se expresan como el valor promedio y la desviación estándar de 15 larvas por concentración y fueron analizados con un ANOVA de dos vías. Los grupos con asteriscos son estadísticamente diferentes con respecto al control. ( $p < 0.05$ ).

### VI.3.3 Área ocular

La población larvaria tratada con la CT<sub>45</sub>, mostró una reducción del 45% del área ocular respecto al control, mientras que las CT<sub>30</sub> y CT<sub>25</sub> mostraron ambas un valor de reducción igual al 32% respecto al grupo control, como lo muestra la relación entre el área ocular en milímetros cuadrados y el rango de las CT de la glucosa (Fig. 19).

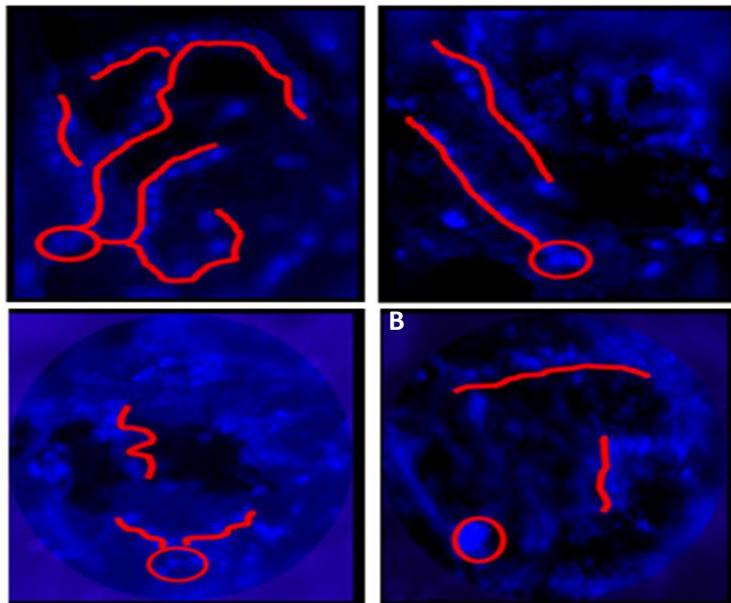


**Figura 19. Área ocular vs concentración.** Los datos se expresan como el valor promedio y la desviación estándar de 15 larvas por concentración y fueron analizados con un ANOVA de una vía. Los grupos con asteriscos son estadísticamente diferentes con respecto al control. ( $p < 0.05$ )

### VI.3.4 Arquitectura de la microvasculatura ocular.

La microvasculatura ocular del grupo control se caracterizó por mostrar una red de vasos hialoides de distintas longitudes dispuestos de manera periférica en el globo ocular y conectados al nervio central como se muestra en el registro (Fig. 20 A). Sin embargo, el tratamiento de las larvas con las CT de glucosa estudiadas, ocasionó tanto la pérdida de los vasos hialoides cortos con la CT<sub>25</sub> (Fig. 20B), los largos con el uso de la CT<sub>30</sub> (Fig. 20C), así como la pérdida de la estructura de la red de dichos vasos, hasta la destrucción total de

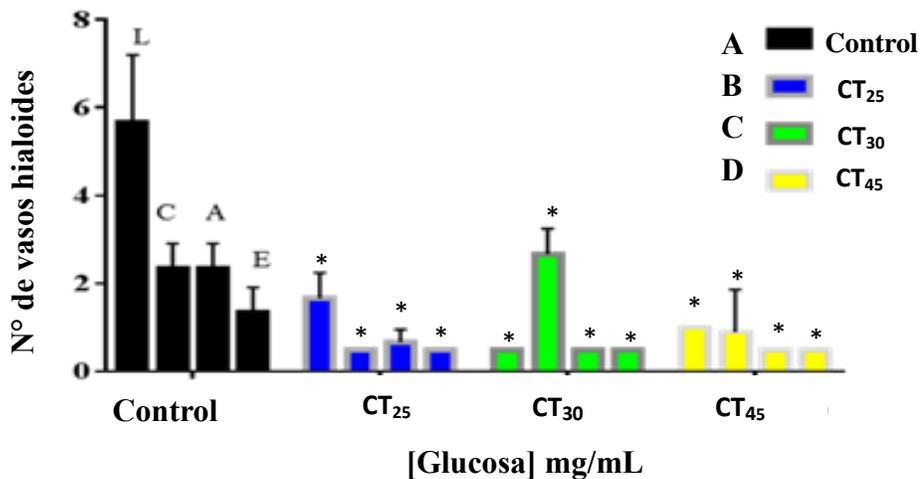
la arquitectura característica a una  $CT_{45}$ , incluyendo la conexión de los vasos con el nervio central (Fig. 20D). Además se observó la reducción progresiva de cada uno de los parámetros evaluados sobre los vasos hialoides, los cuales incluyen: el número, la longitud, la curvatura, el ángulo y la distancia euclidiana en grupos larvarios expuestos a las concentraciones tóxicas  $CT_{25}$ ,  $CT_{30}$  y  $CT_{45}$  respecto al grupo control.



**Figura 20. Registro morfológico de la microvasculatura ocular de larvas de pez cebra.** **A.** Larvas control, se destaca el detalle del nervio central y de los vasos hialoides. **B.** Grupo larvario expuesto  $CT_{25}$ . **C.** Grupo larvario expuesto a la  $CT_{30}$ . **D.** Grupo larvario expuesto a la  $CT_{45}$ .

La biometría vascular presentó respecto al grupo control: pérdida en el número de vasos hialoides superior al 60% en todos los grupos tratados con el rango de CT. La longitud disminuyó respecto al grupo control un 83% en las larvas tratadas con las concentraciones  $CT_{30}$  y  $CT_{45}$  de glucosa, mientras que el grupo tratado con la  $CT_{25}$  mostró una reducción del 67%. La curvatura disminuyó en más de un 60% para las larvas tratadas con las  $CT_{30}$  y  $CT_{45}$  y aumentó un 10% para el grupo larvario tratado con  $CT_{25}$ . La pérdida de los ángulos

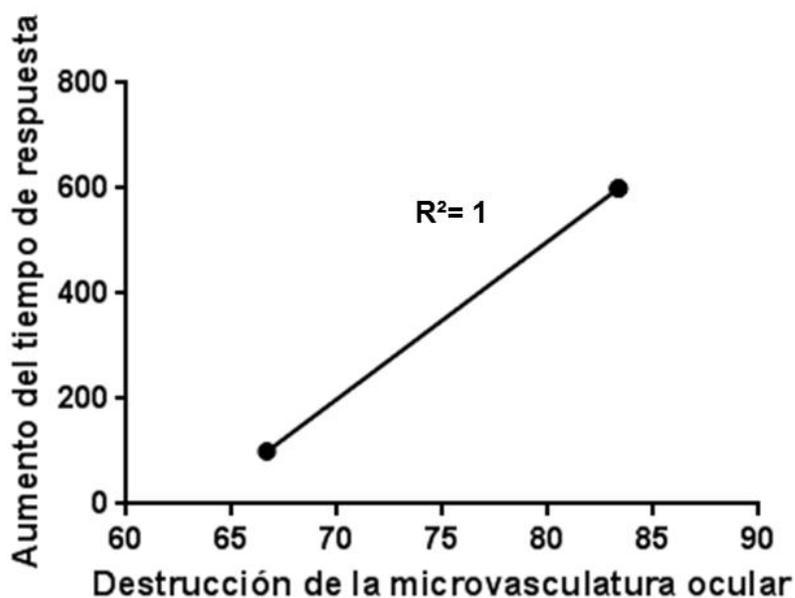
entre los vasos hialodeos fue de 76% para las larvas tratadas con las concentraciones CT<sub>30</sub> y CT<sub>45</sub>, y de un 60% para las tratadas con la CT<sub>30</sub>. Por último, la distancia euclidiana de los vasos disminuyó en un 67% en todos los grupos larvarios tratados con las CT de glucosa (Fig. 21).



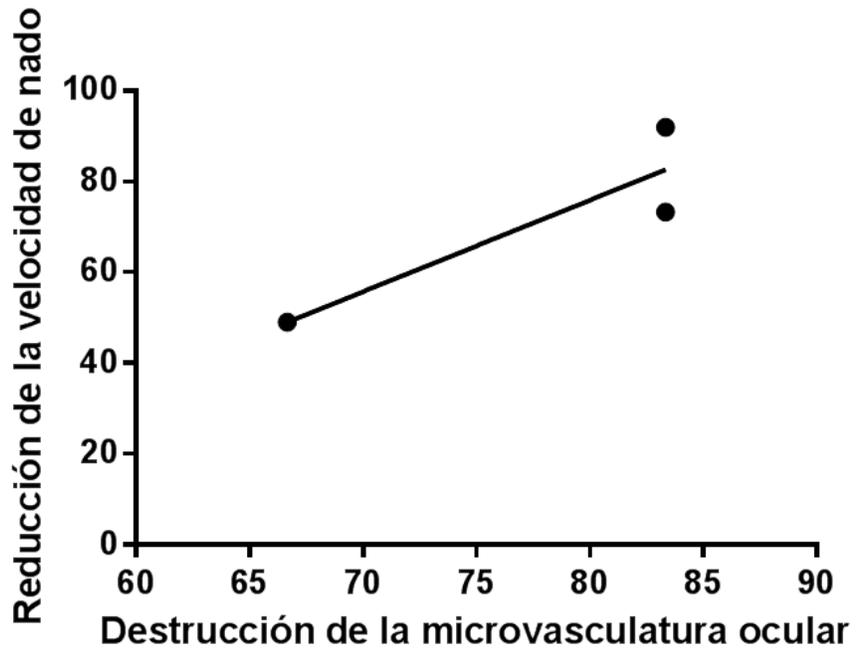
**Figura 21. Número de vasos hialoides vs concentraciones de glucosa.** Representación gráfica de la media aritmética de cada uno de los parámetros evaluados; largo (L), curvatura (C), Ángulo (A) y distancia euclidiana (E) para cada uno de los grupos control y tratados de glucosa. Los datos se expresan como el valor promedio y la desviación estándar de 15 larvas por concentración y fueron analizados con un ANOVA de dos vías. Los grupos con asteriscos son estadísticamente diferentes con respecto al control ( $p < 0.05$ )

#### VI. 4 Correlación entre las respuestas morfológicas y funcionales

Este método estadístico permitió establecer de manera cuantitativa el posible vínculo morfo funcional. La relación entre la destrucción de la microvasculatura ocular y el aumento del tiempo de respuesta fue de uno, por lo tanto positiva e ideal. Por otra parte la relación entre la destrucción de la microvasculatura ocular y la reducción de la velocidad de nado fue muy cercana a uno (Fig. 23). Por lo tanto, dicha relación también fue positiva (Fig. 23).



**Figura 22.** Correlación entre la destrucción de la microvasculatura ocular vs el aumento del tiempo de respuesta a un estímulo ( $p < 0.5$ )



**Figura 23.** Destrucción de la microvasculatura ocular vs Reducción en la distancia de nado ( $p < 0.5$ )

## VII. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos permitieron caracterizar el daño inducido por la acción de la glucosa sobre el modelo larvario de pez cebra de 5 dpf; caracterización definida a través de tres concentraciones tóxicas estimadas y a través de las distintas respuestas obtenidas a nivel cognitivo y las obtenidas a nivel de la microvasculatura ocular de la población larvaria expuesta al rango de concentraciones estimado.

Respecto a las concentraciones tóxicas de glucosa estimadas en la presente investigación, los resultados mostraron tres concentraciones: 25 mg/mL, 30 mg/mL y 45mg/mL, sugeridas como tóxicas, ya que bajo su acción se presentaron las mayores y más significativas expresiones de daño sobre el modelo larvario de pez cebra. Los daños evaluados resultaron concentración-dependiente, siendo estos más acentuados a mayor concentración y por tanto mostrando mayor potencia (Rahma y col, 2017; Singh y col, 2019).

De acuerdo a las distintas respuestas obtenidas a nivel cognitivo, cabe destacar que estas han sido descritas a través de parámetros como el tiempo de respuesta a determinados estímulos, el registro de la actividad locomotora a través del seguimiento de la trayectoria y la determinación de la velocidad de nado bajo distintas condiciones de experimentación. Una de las condiciones experimentales bastante explorada, ha sido promover condiciones de intoxicación con drogas de distinta naturaleza y bajo esa condición obtener respuestas a un estímulo lumínico (Macaulay y col, 2015). Así, larvas de pez cebra tratadas con pseudoalcaloides como la aconitina, molécula que presenta en su estructura grupos metilos, carbonilos e hidroxilos; muestran bajo esa condición, un tiempo de respuesta ante un estímulo lumínico, superior a los 5 segundos (Ellis y col, 2012). Por otra parte, larvas expuestas a inhibidores sintéticos de la nicotinamida fosforibosiltransferasa (NAMPT),

enzima catalizadora de la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), como los A-1466391, A-1459319 y A-145879, presentaron, bajo esa condición, respuestas diferenciales ante el estímulo lumínico. Así los dos primeros inhibidores muestran un tiempo de respuesta al estímulo de luz de 3 segundos; mientras que larvas expuestas al inhibidor A-1325236 presentaron un tiempo de respuesta menor a 1 segundo (Cassar y col, 2018). También, sustancias como el etanol, con grupo hidroxilo altamente reactivo, han sido evaluadas (Irons y col, 2010). Así, el tiempo de respuesta al estímulo lumínico, bajo la condición de intoxicación con etanol, se presenta dependiente de la concentración; a mayor concentración de etanol aumenta el tiempo de aparición de la respuesta y viceversa. Sin embargo, este tiempo de respuesta en las larvas expuestas al etanol no supera al alcanzado con los tiempos expuestos anteriormente. En cuanto a los parámetros de trayectoria y velocidad de nado, bajo condiciones de intoxicación por sustancia químicas y posterior estimulación lumínica, cabe destacar que larvas de pez cebra, expuestas a fármacos estimulantes de la actividad del sistema nervioso como el pentilenotetrazol, molécula constituida por dos estructuras cíclicas y átomos de nitrógeno, bajo esa condición y luego de un estímulo lumínico presentaron una trayectoria de nado con orientación periférica y aumento significativo de la velocidad, mientras que larvas tratadas con un fármaco bloqueante de los canales de potasio como la 4-aminopiridina, molécula que presenta en su estructura cíclica un grupo amino reactivo, muestran igual trayectoria de nado con orientación periférica (Ellis y col, 2012). Comparando estos resultados presentados por otros autores con los resultados obtenidos en la presente investigación, se destaca un tiempo de respuesta promedio equivalente a 1.5 segundos, resultando aproximadamente un 50% por debajo del tiempo promedio de la respuesta expresados por otros autores. Por su parte, la trayectoria de nado con orientación periférica obtenida, coincidió con la descrita por

otros autores. Dicho comportamiento ha sido característico del trastorno de ansiedad en distintos modelos animales de experimentación (Prut y Belzung, 2003; Sousa col, 2006; Schnörr y col, 2012). En cuanto a la velocidad de nado obtenida en este trabajo, la misma coincidió con la reportada en larvas expuestas a agentes bloqueantes de canales de potasio.

Por otra parte, las mismas condiciones experimentales de intoxicación con drogas han permitido describir la toxicidad a nivel anatómico a través del daño generado en órganos particulares como el globo ocular y la microvasculatura ocular, así como también a través de parámetros como la estructura corporal y la estructura craneofacial.

Respecto a las expresiones de daño ocasionadas por distintas drogas en órganos particulares como el globo ocular han sido caracterizadas a través del análisis de la microvasculatura retinal (Wang y col, 2012). Así, larvas de pez cebra tratadas con compuestos ricos en grupos amino como la feniltiourea mostraron una reducción significativa del área de la superficie ocular (Li y col, 2012). Cabe destacar que la concentración de este compuesto se encuentra muy por debajo de las concentraciones de glucosa utilizadas en esta investigación.

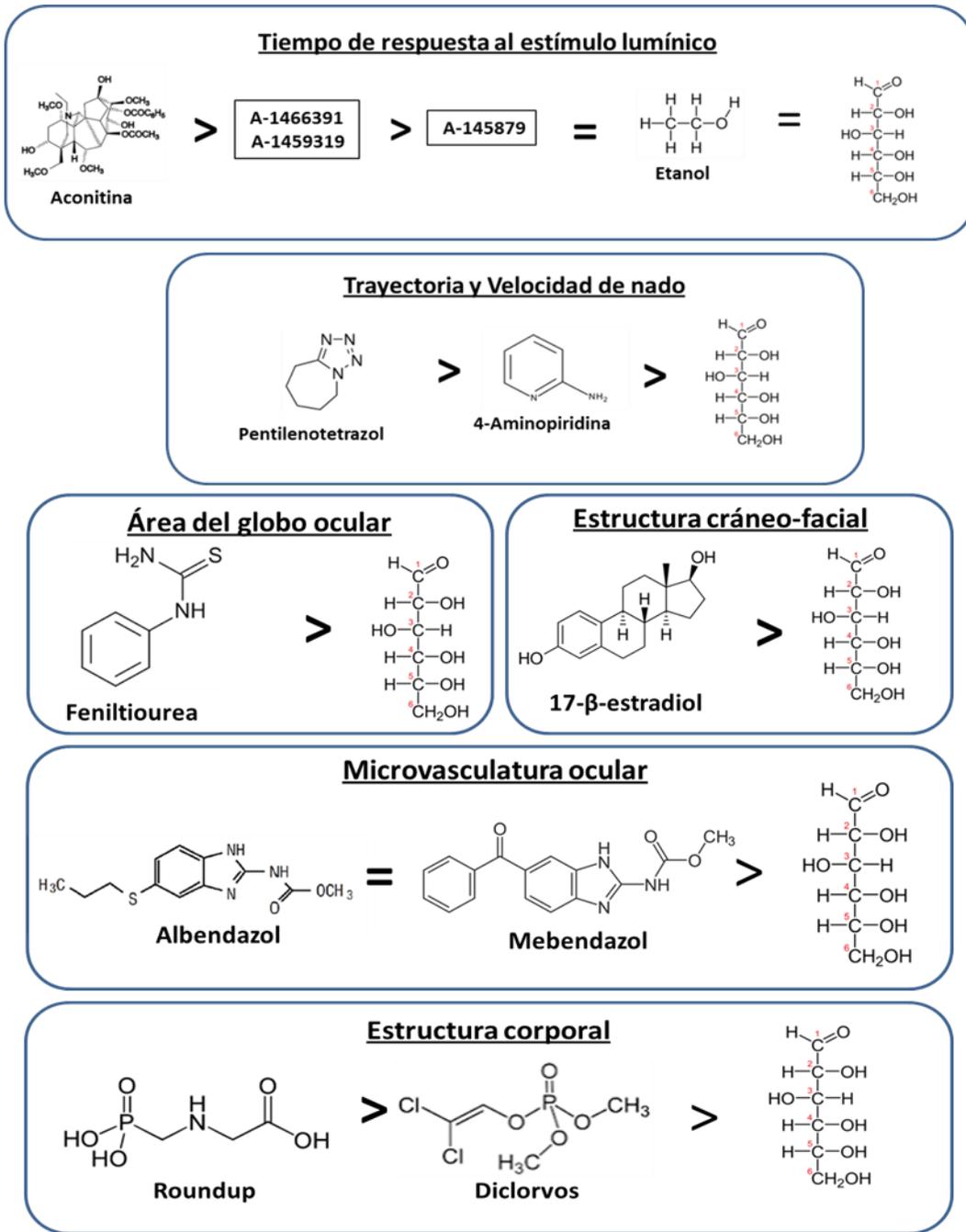
En cuanto a la microvasculatura ocular, larvas expuestas a compuestos orgánicos, así como derivados del benzimidazol (Kitambi y col, 2009) muestran una pérdida significativa de los vasos sanguíneos que componen la estructura microvascular ocular, así como las características de cada uno de ellos. Es importante resaltar que las concentraciones utilizadas en estas investigaciones se encuentran muy por debajo de las concentraciones de glucosa utilizadas en la presente investigación. También ha sido reportado con anterioridad, que la toxicidad de la glucosa genera cambios a nivel histológico y bioquímico. A nivel

histológico, se han reportado daños significativos sobre las distintas capas celulares que componen la retina; particularmente la reducción de la capa plexiforme interna (CPI) y el aumento de la capa nuclear interna (CNI), las cuales están compuestas por los núcleos y las conexiones sinápticas de las células de Müller, amacrinas y horizontales (Link y Collery, 2015; Gleeson y col, 2017; Singh y col, 2019). A nivel bioquímico, se ha reportado la sobreproducción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y de óxido de nitrógeno. A pesar de no haber abordado en esta experimentación aspectos histológicos y bioquímicos de la toxicidad de la glucosa, es posible que dichos aspectos tengan alguna participación en los resultados obtenidos en esta investigación

En cuanto a parámetros como la estructura corporal y la estructura cráneo facial, larvas de pez cebra tratadas con compuestos organofosforados ricos en grupos fosfato (Bridi y col, 2017; Altenhofen y col, 2019) muestran una reducción significativa de la longitud corporal dependientes de la concentración. Cabe destacar que las concentraciones de estos compuestos se encuentran muy por debajo de las concentraciones de glucosa utilizadas en esta investigación. Por otra parte, el análisis cuantitativo de las alteraciones de la región cráneo facial de la población larvaria tratada con glucosa, concuerdan con reportes realizados por otros autores (Staal y col, 2018) demostrada con otro tipos de compuestos, entre ellos el 17- $\beta$ -estradiol (Cohen y col, 2014). El uso de compuestos similares a la glucosa, han también apoyado la reevaluación de la cuantificación de la malformación del esqueleto inducida por estos agentes. Queda demostrado que las malformaciones esqueléticas del desarrollo pueden analizarse cuantitativamente sin tinción haciendo uso del análisis de imagen en programas como ImageJ en embriones de pez cebra de 5 dpf. Las distintas mediciones de los segmentos así demostradas podrían por tanto a contribuir a

realizar la selección de los parámetros más representativos para el diagnóstico de malformaciones esqueléticas. De igual manera al evaluar compuestos con posible acción óseo-tóxica. Así por ejemplo el uso del ángulo de Meckel-Palatoc cuadrado (M-PQ) podría ser más significativo. Evaluaciones adicionales podrían también resultar eficientes ya que podrían ser medidas con mayor precisión, considerando otras combinaciones entre los segmentos evaluados. Cabe destacar que el ángulo entre los cartílagos M-PQ obtenido en la presente investigación coinciden con el aumento del ángulo entre los cartílagos M-PQ dependiente de la concentración reportado por otros autores.

Tales evidencias contrastadas con los resultados obtenidos en esta investigación han permitido clasificar a la glucosa como un agente tóxico de riesgo, si ésta es consumida en concentraciones significativamente elevadas.



**Figura 24.** Esquema comparativo entre diferentes compuestos tóxicos y la glucosa según las respuestas morfológicas y funcionales en larvas de pez cebra

Por otra parte, el vínculo morfo funcional fue establecido entre la destrucción de la microvasculatura ocular y el aumento del tiempo de respuesta a un estímulo lumínico junto

con la disminución de la velocidad de nado en el modelo larvario de pez cebra tratado con distintas concentraciones tóxicas de la glucosa. La relación entre las otras variables fueron muy pequeñas (resultados no mostrados), por lo tanto las únicas variables relacionadas en este vínculo son las nombradas con anterioridad.

## VIII. CONCLUSIONES

- El vínculo morfo funcional se estableció entre la destrucción de la microvasculatura ocular y el aumento del tiempo de respuesta a un estímulo lumínico junto con la disminución de la velocidad de nado en el modelo larvario de pez cebra tratado con distintas concentraciones tóxicas de glucosa.
- La toxicidad ejercida por la glucosa a un nivel cognitivo y a un nivel anatómico es dependiente de la concentración.
- El rango de concentraciones tóxicas de la glucosa generó un deterioro significativo en el comportamiento locomotor larvario
- El rango de concentraciones tóxicas de la glucosa modificó la morfología corporal y de órganos específicos como el globo ocular, así como de estructuras particulares como la microvasculatura ocular de lavas de pez cebra
- La respuesta morfo funcional de la toxicidad de la glucosa fue establecida a través del vínculo entre el daño retinal y la respuesta cognitiva, expresada en el modelo larvario de pez cebra tratado con distintas concentraciones tóxicas de la glucosa estimadas en la presente investigación.
- El modelo larvario de pez cebra de 5dpf podría certificarse como un modelo eficiente en el estudio de la toxicidad de la glucosa.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Ahmad, F., Noldus, L. P., Tegelenbosch, R. A., Richardson, M. K. 2012. Zebrafish embryos and larvae in behavioral assays. *Behavior*. **149(10)**: 1241.
2. Altenhofen, S., Nabinger, D. D., Bitencourt, P. E. R., Bonan, C. D. 2019. Dichlorvos alters morphology and behavior in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Environ pollut.* **245**: 1117-1123.
3. Alvarez, Y., Cederlund, M. L., Cottell, D. C., Bill, B. R., Ekker, S. C., Torres-Vazquez, J., Kennedy, B. N., y colaboradores. 2007. Genetic determinants of hyaloid and retinal vasculature in zebrafish. *BMC developmental biology*. **7(1)**: 114.
4. Álvarez, M., Guadarrama, R., Arias, M., Perdomo, L., Navarro, E. 2017b. Interacción fluoruro de sodio con *Moringa oleifera* en sangre periférica de pez cebrá *Danio rerio*. *RETEL*. **38-49**.
5. Álvarez, M., Vanessa, G., Arias, M., Perdomo, L., Navarro, E. 2017a. Acrilamida y *Amaranthus dubius* L en células sanguíneas de pez Cebrá *Danio rerio*. *RETEL*. **28-37**.
6. Álvarez, M., Perdomo, L., Navarro, E. 2017c. El ozono (O<sub>3</sub>) reduce la afinidad tisular a la eritrosina en modelo larvario de Pez Cebrá *Danio rerio*. *RETEL*. **14-21**
7. Andonegui, J., Serrano, L., Eguzkitza, A. 2013. eOphthalmology: Current state and future tendencies. *An. Sist. Sanit. Navar.* **33**: 79-91.
8. Andrade, T.S., Henriques, J.F., Almeida, A.R., Machado, A.L., Koba, O., Giang, P.T., Soares, A.M., Domingues, I. 2016. Carbendazim exposure induces developmental, biochemical and behavioral disturbance in zebrafish embryos. *Aquat. Toxicol.* **170**: 390–399.

9. Arias, M. 2017. Riesgo cardiotoxico de la infusión de hojas frescas de *plectranthus neochilus* en el modelo larvario de pez cebra *Danio rerio*. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela
10. Bannier, K., Lichtenauer, M., Franz, M., Fritzenwanger, M., Kabisch, B., Figulla, H. R., Jung, C. 2015. Impact of diabetes mellitus and its complications: survival and quality-of-life in critically ill patients. *J. Diabetes Complicat*, **29(8)**: 1130-1135.
11. Borla, M. A., Palecek, B., Budick, S. O'Malley, D. M. 2002. Prey capture by larval zebrafish: evidence for fine axial motor control. *Brain Behav. Evol.* **60**: 207-229.
12. Bozic, I., Li, X., Tao, Y. 2018. Quantitative biometry of zebrafish retinal vasculature using optical coherence tomographic angiography. *Biomed opt. Express.* **9(3)**: 1244-1255.
13. Bridi, D., Altenhofen, S., Gonzalez, J. B., Reolon, G. K., Bonan, C. D. 2017. Glyphosate and Roundup® alter morphology and behavior in zebrafish. *Toxicology*, **392**: 32-39.
14. Brown, D. 2019. Tracker Video Analysis and Modeling Tool (Version 5.1.2) [Computer software]. Retrieved August 21, 2019, from
15. Budick, S., O'Malley, D. 2000. The behavioral repertoire of larval zebrafish: swimming, escaping and prey capture. *J. Exp. Biol.* **203**: 2565-2579.
16. Burgess, H. A., Granato, M. 2007. Modulation of locomotor activity in larval zebrafish during light adaptation. *J. Exp. Biol.* **210(14)**: 2526-2539.
17. Campos, C. 2012. Chronic hyperglycemia and glucose toxicity: pathology and clinical sequelae. *Postgrad. Med.* **124(6)**: 90-97.

18. Capiotti, K. M., Junior, R. A., Kist, L. W., Bogo, M. R., Bonan, C. D., Da Silva, R. S. 2014. Persistent impaired glucose metabolism in a zebrafish hyperglycemia model. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* **171**: 58-65.
19. Cassar, S., Dunn, C., Olson, A., Buck, W., Fossey, S., Ramos, M. F., Bratcher, N. y colaboradores. 2018. From the Cover: Inhibitors of Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Cause Retinal Damage in Larval Zebrafish. *Toxicol. Sci.* **2**: 300-309
20. Cohen, S. P., LaChappelle, A. R., Walker, B. S., Lassiter, C. S. 2014. Modulation of estrogen causes disruption of craniofacial chondrogenesis in *Danio rerio*. *Aquat. Toxicol.* **152**: 113-120.
21. Cornet, C., Calzolari, S., Miñana-Prieto, R., Dyballa, S., van Doornmalen, E., Rutjes, H., Terriente, J. y colaboradores. 2017. ZeGlobalTox: an innovative approach to address organ drug toxicity using zebrafish. *Int. J. Mol. Sci.* **18(4)**, 864.
22. Devlin, T. M. 2004. Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas. Reverté. Cuarta edición, Barcelona, España.
23. Ellis, L. D., Seibert, J., Soanes, K. H. 2012. Distinct models of induced hyperactivity in zebrafish larvae. *Brain res.* **1449**: 46-59.
24. Espinosa, M. B. 2016. El Pez Cebrá: una Herramienta en Educación. *Revista de Educación en Biología.* **19(1)**: 11.
25. Feit-Leichman, R. A., Kinouchi, R., Takeda, M., Fan, Z., Mohr, S., Kern, T. S., Chen, D. F. 2005. Vascular damage in a mouse model of diabetic retinopathy: relation to neuronal and glial changes. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* **46(11)**: 4281-4287.
26. Fleming, A., Alderton, W. K. 2013. Zebrafish in pharmaceutical industry research: finding the best fit. *Drug Discov. Today Dis. Models.* **10(1)**: 43-50.

27. Forn-Cuni, G., Varela, M., Fernandez-Rodriguez, C. M., Figueras, A., Novoa, B. 2015. Liver immune responses to inflammatory stimuli in a diet-induced obesity model of zebrafish. *J Endocrinol.* **224(2)**: 159-170.
28. Gahtan, E., Tanger, P., Baier, H. 2005. Visual prey capture in larval zebrafish is controlled by identified reticulospinal neurons downstream of the tectum. *J. Neurosci.* **25**: 9294-9303.
29. Gambeta, E., de Souza, C. P., de Moraes, H., Zanoveli, J. M. 2016. Reestablishment of the hyperglycemia to the normal levels seems not to be essential to the anxiolytic-like effect induced by insulin. *Metab. Brain. Dis.* **31(3)**: 563-571.
30. Gamez, C., Ramírez, E. 2008. Determinación de la concentración letal media (CL<sub>50-48</sub>) del herbicida Roundup 747 sobre ecosistemas acuáticos mediante pruebas toxicológicas con *Daphnia magna*. Trabajo de licenciatura. Universidad de la Salle. Bogotá, Colombia
31. Gestri, G., Link, B. A., Neuhauss, S. C. 2012. The visual system of zebrafish and its use to model human ocular diseases. *Dev. Neurobiol.* **72(3)**: 302-327.
32. Giri, B., Dey, S., Das, T., Sarkar, M., Banerjee, J., Dash, S. K. 2018. Chronic hyperglycemia mediated physiological alteration and metabolic distortion leads to organ dysfunction, infection, cancer progression and other pathophysiological consequences: An update on glucose toxicity. *Biomed. Pharmacother.* **107**: 306-328.
33. Gleeson, M., Connaughton, V., Arneson, L. S. 2007. Induction of hyperglycemia in zebrafish (*Danio rerio*) leads to morphological changes in the retina. *Acta Diabetol.* **44(3)**, 157-163.

34. González Flecha, F. L., Castello, P. R., Gagliardino, J. J., Rossi, J. P. F. C. 2000. La glucosilación no enzimática de proteínas. Mecanismo y papel de la reacción en la diabetes y el envejecimiento. *Ciencia al Día Internacional*, **3(2)**, 1-17.
35. Guerra, J., Cabezas, P., Yebra, E., Gutiérrez, C., Cedrón, V., Otero, M., Sánchez, L. 2016. “A Zebra in the Water”: Inspiring Science in Spain. *Zebrafish*. **13(4)**: 241-247.
36. Hashiura, T., Kimura, E., Fujisawa, S., Oikawa, S., Nonaka, S., Kurosaka, D., Hitomi, J. 2017. Live imaging of primary ocular vasculature formation in zebrafish. *Plos One*, **12(4)**, 176-456.
37. Huang, D., Refaat, M., Mohammedi, K., Jayyousi, A., Al Suwaidi, J., Abi Khalil, C. 2017. Macrovascular complications in patients with diabetes and prediabetes. *Bio Med Res. Intl*
38. Irons, T. D., MacPhail, R. C., Hunter, D. L., Padilla, S. 2010. Acute neuroactive drug exposures alter locomotor activity in larval zebrafish. *Neurotoxicol. Teratol.* **32(1)**: 84-90.
39. Issa, F. A., O'Brien, G., Kettunen, P., Sagasti, A., Glanzman, D. L., Papazian, D. M. 2011. Neural circuit activity in freely behaving zebrafish (*Danio rerio*). *J. Exp Biol.* **214(6)**: 1028-1038.
40. Jin, Y., Zhu, Z., Wang, Y., Yang, E., Feng, X., Fu, Z. 2016. The fungicide imazalil induces developmental abnormalities and alters locomotor activity during early developmental stages in zebrafish. *Chemosphere*. **153**: 455-461.
41. Jung, S. H., Kim, Y. S., Lee, Y. R., y Kim, J. S. 2016. High glucose-induced changes in hyaloid-retinal vessels during early ocular development of zebrafish: a short-term animal model of diabetic retinopathy. *Brit. J. Pharmacol.* **173(1)**: 15-26.

42. Kalueff, A. V., Cachat, J. M. 2011. Zebrafish models in neurobehavioral research. Humana Press. Primera edición. Nueva York, E.U.A
43. Kari, G., Rodeck, U., Dicker, A. P. 2007. Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery. *Clin. Pharmacol. Ther.* **82(1)**: 70-80.
44. Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., Schilling, T. F. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dynam.* **203(3)**: 253-310.
45. Kitambi, S. S., McCulloch, K. J., Peterson, R. T., Malicki, J. J. 2009. Small molecule screen for compounds that affect vascular development in the zebrafish retina. *Mech. Dev.* **126(5-6)**: 464-477.
46. Koch, M. 1999. The neurobiology of startle. *Progr. Neurobiol.* **59**: 107-128.
47. Li, Z., Ptak, D., Zhang, L., Walls, E. K., Zhong, W., Leung, Y. F. 2012. Phenylthiourea specifically reduces zebrafish eye size. *PLoS One.* **7(6)**: e40132.
48. Link, B. A., Collery, R. F. 2015. Zebrafish models of retinal disease. *Annu. Rev. Vis. Sc.* **1**: 125-153.
49. Lopez-Luna, J., Al-Jubouri, Q., Al-Nuaimy, W., Sneddon, L.U. 2017. Impacto del estrés, el miedo y la ansiedad en las respuestas nociceptivas del pez cebra larval. *PloS one.* **12 (8)**: e0181010.
50. Macaulay, L. J., Bailey, J. M., Levin, E. D., Stapleton, H. M. 2015. Persisting effects of a PBDE metabolite, 6-OH-BDE-47, on larval and juvenile zebrafish swimming behavior. *Neurotoxicol. Teratol.* **52**: 119-126.
51. McElligott, M., O'Malley, D. 2005. Prey tracking by larval zebrafish: axial kinematics and visual control. *Brain Behav. Evol.* **66**: 177-196.

52. MacPhail, R.C., Brooks, J., Hunter, D.L., Padnos, B., Irons, T.D. Padilla, S. 2009. Locomotion in larval zebrafish: influence of time of day, lighting and ethanol. *Neurotoxicology*. **30**: 52-58.
53. Malone, J. I. 2016. Diabetic central neuropathy: CNS damage related to hyperglycemia. *Diabetes*. **65(2)**: 355-357.
54. Mantilla, M. E. T. 2001. La hiperglicemia y sus efectos tóxicos. Un concepto patogénico para la micro y macroangiopatía diabética. *Rev Cubana Angiol y Cir. Vasc*. **2(2)**: 131-41.
55. Moulton, C. D., Pickup, J. C., Ismail, K. 2015. The link between depression and diabetes: the search for shared mechanisms. *Lancet Diabetes Endocrinol*. **3(6)**: 461-471.
56. Prut, L., Belzung, C. 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharmacol*. **463(1-3)**: 3-33.
57. Purewal, R., Fisher, P. L. 2018. The contribution of illness perceptions and metacognitive beliefs to anxiety and depression in adults with diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract*. **136**: 16-22.
58. Rahma, K., Kishida, M., Prasetyawan, S., Aulanni'am, A. A. 2017. Effects of D-Glucose Exposure on Motor Activity by Swimming Distance During Early Development of Zebrafish (*Danio rerio*). *Int J. Pharma. Clin Res*. **9(2)**: 105-107
59. Richardson, R., Tracey-White, D., Webster, A., Moosajee, M. 2017. The zebrafish eye—a paradigm for investigating human ocular genetics. *Eye*. **31(1)**: 68.
60. Robertson, R. P., Harmon, J., Tran, P. O., Tanaka, Y., Takahashi, H. 2003. Glucose toxicity in  $\beta$ -cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes*. **52(3)**: 581-587.

61. Robinson, R., Barathi, V. A., Chaurasia, S. S., Wong, T. Y., Kern, T. S. 2012. Update on animal models of diabetic retinopathy: from molecular approaches to mice and higher mammals. *Dis. Model. Mech.* **5(4)**: 444-456
62. Rocha, A., Ruiz, S., Coll, J. 2002. Método sencillo para producir huevos embrionados de pez Cebra. *Investigación agraria: Producción y sanidad animal*, **17**: 1-2.
63. Rueden, C. T.; Schindelin, J. Hiner, M. C. 2017. "ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data". *Bioinformatics* 18:529
64. Schnörr, S. J., Steenbergen, P. J., Richardson, M. K., Champagne, D. L. 2012. Measuring thigmotaxis in larval zebrafish. *Behav. Brain. Res.* **228(2)**: 367-374.
65. Singh, A., Castillo, H. A., Brown, J., Kaslin, J., Dwyer, K. M., Gibert, Y. 2019. High glucose levels affect retinal patterning during zebrafish embryogenesis. *Sci. Rep-UK.* **9(1)**: 4121.
66. Sousa, N., Almeida, O. F. X., Wotjak, C. T. 2006. A hitchhiker's guide to behavioral analysis in laboratory rodents. *Genes. Brain. Behav.* **5**: 5-24.
67. Staal, Y. C., Meijer, J., van der Kris, R. J., de Bruijn, A. C., Boersma, A. Y., Gremmer, E. R., van der Ven, L. T y colaboradores. 2018. Head skeleton malformations in zebrafish (*Danio rerio*) to assess adverse effects of mixtures of compounds. *Arch. Toxicol.* **92(12)**: 3549-3564.
68. Stehouwer, C. D. 2018. Microvascular dysfunction and hyperglycemia: a vicious cycle with widespread consequences. *Diabetes.* **67(9)**: 1729-1741.
69. Stewart, W. J., Cardenas, G. S., McHenry, M. J. 2013. Zebrafish larvae evade predators by sensing water flow. *J. Exp. Biol.* **216(3)**: 388-398.

70. Tanguay, R. L. 2018. The Rise of Zebrafish as a Model for Toxicology. *Toxicol. Sci.* **163(1)**: 3-4
71. Vancampfort, D., Mitchell, A. J., De Hert, M., Sienaert, P., Probst, M., Buys, R., Stubbs, B. 2015. Type 2 diabetes in patients with major depressive disorder: a meta-analysis of prevalence estimates and predictors. *Depress. Anxiety.* **32(10)**: 763-773.
72. Wang, Y. P., Hong, Q., Qin, D. N., Kou, C. Z., Zhang, C. M., Guo, M., Tong, M. L. y colaboradores. 2012. Effects of embryonic exposure to polychlorinated biphenyls on zebrafish (*Danio rerio*) retinal development. *J. Appl. Toxicol.* **32(3)**: 186-193.