



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE FARMACIA

EFFECTOS DE LA GENTAMICINA, NETILMICINA Y AMIKACINA SOBRE
LOS NÚCLEOS DE MINERALIZACIÓN ÓSEA EN EL MODELO
LARVARIO DEL PEZ CEBRA (*Danio rerio*).

Autor: Licda. Yamilet Del V. Rivas Castillo

Caracas, Mayo 2015



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE FARMACIA
POSTGRADO DE TOXICOLOGIA



**EFFECTOS DE LA GENTAMICINA, NETILMICINA Y
AMIKACINA SOBRE LOS NÚCLEOS DE
MINERALIZACIÓN ÓSEA EN EL MODELO LARVARIO DE
PEZ CEBRA (*Danio rerio*).**

LICENCIADA EN BIOANÁLISIS YAMILET DEL V. RIVAS CASTILLO

Trabajo de grado presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela
para optar al título de Magíster Scientiarum en Toxicología

TUTOR: DOCTOR MARCO A. ÁLVAREZ O.

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Central de Venezuela en especial al Laboratorio de Microscopía Electrónica del Instituto Anatómico “José Izquierdo”, por permitirme llevar a cabo esta investigación

A mi tutor el Dr. Marco Álvarez, por su paciencia, apoyo y confianza. Para usted y su equipo de investigación GRACIAS.

A la Lcda. Lourdes Perdomo, por su apoyo y por su disposición incondicional para brindarnos sus conocimientos y experiencias.

A la Dra. Gladys Romero de Galí por ser más que una guía académica, moral y espiritual en todo momento, por confiar en mis potencialidades.

A la Teniente Celsymar Mujica por su apoyo e infaltables ocurrencias en el momento más difícil en el desarrollo de este trabajo.

A la familia Adler Gordan, en especial a la Sra. Ana Gordan de Adler por su comprensión y apoyo incondicional desde el inicio de esta travesía. Para usted estas palabras de Claudio Naranjo “Cualquier libro puede describir una técnica, pero una actitud debe ser transmitida por una persona”. Gracias...

A Irene y Nigiolys por ser mis amigas y apoyarme siempre

A la Licda. Natassia Márquez y Claudia Hernández por su colaboración en esta investigación.

A todos los profesores del Postgrado de Toxicología de UCV por haberme brindado sus conocimientos en especial a la Profa. Gladys Venegas.

DEDICATORIA.

A mis padres, por todo lo que hicieron para ser los artífices de mi formación.

A mis hermanos y sobrinos por ser mis ángeles terrenales.

A mi Esposo E. Ignacio, por ser mi columna vertebral, gracias por hacer de mí una mejor persona. Desde que te conocí disfruto aun más este maravilloso viaje llamado “vida”.

A mi hijo Luis Ignacio, la razón de hoy estar escribiendo estas palabras. Gracias por ayudarme a continuar cada vez que estuve cansada.

Los Amo...



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE FARMACIA

POSTGRADO DE TOXICOLOGIA



**EFFECTOS DE LA GENTAMICINA, NETILMICINA Y AMIKACINA
SOBRE LOS NÚCLEOS DE MINERALIZACIÓN ÓSEA EN EL
MODELO LARVARIO DE PEZ CEBRA (*Danio rerio*).**

Licenciada en Bioanálisis Yamilet del V. Rivas Castillo

Los aminoglicósidos (AG) han sido conocidos por su acción bactericida, asociada a efectos tóxicos sobre los osteoblastos. Sin embargo, el daño óseo no ha sido claramente establecido. La investigación evaluó la toxicidad inducida por Gentamicina, Netilmicina y Amikacina y caracterizó el daño sobre los Núcleos de Mineralización Ósea (NMO), en el modelo Larvario de Pez Cebra *Danio rerio*. Se determinaron las concentraciones letales y tóxicas medias de cada AG y se realizó un análisis macro y microscópico *in vivo*, sobre muestras controles y tratadas, para describir efectos tóxico sub-letales. El Rojo de Alizarina, EL Azul de Toluidina y el Azul de Alcian, además de reacciones inmunohistoquímicas como el TUNEL y la medición enzimática de la Fosfatasa Alcalina y de los niveles de iones calcio y fósforo, permitieron establecer la osteotoxicidad de los AGs. Los AG, resultaron letales a las concentraciones máximas seleccionada y a un tiempo de 72 horas de exposición. La torsión troncal, el desarreglo de la arquitectura de los neuromastomas y la reducción en la velocidad de nado resultaron dependientes de la concentración. Los NMO de la porción cráneo-facial, en larvas tratadas presentaron un reducido histograma de densidad ósea, una pérdida de la arquitectura de los condroblastos y una positiva reacción de TUNEL. Un incremento de fosfatasa alcalina y en la concentración iónica de calcio y fósforo fue determinado. Los resultados establecen un claro daño óseo vinculado con la acción delo AG Gentamicina, Netilmicina y Amikacina, asociado con un proceso de muerte celular por apoptosis.

Palabras claves: Aminoglicósidos, Pez Cebra, Osteotoxicidad, Núcleos de Mineralización Ósea, Concentración Tóxica 50, Neuromastomas, Condroblastos, Apoptosis.



CENTRAL UNIVERSITY OF VENEZUELA

SCHOOL OF PHARMACY



Effects of Gentamicin, Netilmicin and Amikacin on core mineralization of bone in larval zebrafish model (*Danio rerio*) .

Yamilet del Valle Rivas Castillo Degree in Bioanalysis

SUMMARY.

The Aminoglycosides (AG) have been known for their bactericidal action associate with toxic effects on osteoblasts. However, bone damage was not clearly established. The research evaluated the induced toxicity by Gentamicin, Amikacin and Netilmicin and characterized the damage on Core Mineralization of Bone (CMB), in the larval zebra fish model *Danio rerio*. Lethal and toxic mean concentrations were determined for each AG and macro and microscopic analysis were done *in vivo*, on controls and treated samples to describe sublethal toxicity. Alizarin Red, Toluidine Blue and Alcian Blue, as well as immunohistochemical reaction like TUNEL and enzymatic measurement of alkaline phosphatase and calcium and phosphorus ions, allowed to establish the osteotoxicity of AG. The AG were lethal at concentrations above selected maximum and a time of 72 hours of exposure. The trunk torsion, the disorder of the architecture of neuromastoms and reduction in swimming speed were concentration dependent. The CMB of cranio-facial portion presented a reduced bone density histogram, a loss of chondroblast architecture and a positive TUNEL reaction. Increased alkaline phosphatase activity and ionic concentration of calcium and phosphorus were determined. The results established clearly bone damage, linked to the action of Gentamicin, Amikacin Netilmicin and associate cell death for apoptosis.

Keywords: Amikacin, Zebrafish, Osteotoxicity, Core Mineralization of Bone, Neuromastoms, Toxic effect concentration 50 (TC50), Chondroblast, Apoptosis.

TABLA DE CONTENIDO

Agradecimientos	iii
Dedicatoria	iv
Resumen en Español	v
Resumen en Inglés	vi
TABLA DE CONTENIDO	vii
Lista de Tablas.....	ix
Lista de Figuras.....	x
I. INTRODUCCION	1
I.a. Aminoglicósidos.....	10
I.a.1. Estructura Química de los Aminoglicósidos.....	11
I.a.2. Toxicidad de los Aminoglicósidos.....	12
I.b. El pez cebra como modelo experimental	16
II. OBJETIVOS	21
II.a.1. Objetivo General.....	21
II.a.2. Objetivos Específicos	21
III. MATERIALES Y MÉTODOS	22
III.a. Obtención de los Huevos y Larvas del Pez Cebra	22
III.b. Bioensayo de Toxicidad.....	23
III.c. Señales de osteotoxicidad	25
III.c.1. Núcleos de Osificación	25
III.c.2. Análisis Histoquímico e Inmunohistoquímico.....	26
III.c.3 Análisis Bioquímico.....	30
III.d. Señales generales de acción tóxica	31
III.d.1. Actividad Motora.....	31

III.d.2 Cambios Morfológicos.....	32
III.e. Análisis Estadístico.....	33
IV. RESULTADOS	34
IV.a. Dosificación de los Aminoglicósidos.....	34
IV.a.1. Concentración Letal Media	38
IV.a.2. Concentración Tóxica Media ..	38
IV.b. Efectos Tóxicos.....	38
IV.b.1. Señales Generales de la acción Tóxica de los Aminoglicósidos...38	
IV.b.2. Análisis histoquímico.....	43
IV.b.3 Actividad Enzimática.....	46
IV.b.4. Alteración en el patrón de nado	47
V. DISCUSION	50
V.a. Toxicidad de los Aminoglicósidos.....	50
V.c. Osteotoxicidad.....	51
VI. CONCLUSIONES	56
VII. RECOMENDACIONES	57
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	68

LISTA DE TABLAS.

Tabla I. Arcos Branquiales en peces teleósteos.....	9
Tabla II. Diferentes clases de Aminoglicósidos según su relación azúcar/ciclitol.....	12
Tabla III. Genes comunes existentes en peces, aves y mamíferos.....	17

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de los Núcleos de Osificación.....	2
Figura 2. Estructuras Óseas de Humanos vs peces	4
Figura 3. Cascada de Señalización Osteogénica	5
Figura 4. Histología de los Osteoblastos.....	7
Figura 5. Núcleos de Mineralización del Esqueleto Branquial en Larvas del pez cebra.....	8
Figura 6. Estructura Química de los Aminoglicósidos.....	10
Figura 7a. Larva temprana.....	20
Figura 7b. Pez cebra adulto.....	20
Figura 8a. Curva concentración-repuesta para la gentamicina a las 24, 48, 72 horas de exposición.....	34
Figura 8b. Curva concentración-repuesta para la netilmicina a las 24, 48, 72 horas de exposición.....	35
Figura 8c Curva concentración-repuesta para la amikacina a las 24, 48, 72 horas de exposición	35
Figura 8a'. Relación entre el logaritmo de la concentración de gentamicina vs porcentaje de mortalidad.....	36
Figura 8b'. Relación entre el logaritmo de la concentración de netilmicina vs porcentaje de mortalidad	37
Figura 8c'. Relación entre el logaritmo de la concentración de amikacina vs porcentaje de mortalidad.....	37

Figura 9. Morfología de larva control y expuesta a gentamicina 24, 48, 72 horas de exposición	39
Figura 10. Morfología de larva control y expuesta a netilmicina 24, 48, 72 horas de exposición	40
Figura 11. Morfología de larva control y expuesta a amikacina 24, 48, 72 horas de exposición	40
Figura 12. Fotomicrografía de anatomía cráneo-facial de larvas de pez cebra 5 dpf control y tratadas con gentamicina.	41
Figura 13. Fotomicrografía de anatomía cráneo-facial de larvas de pez cebra 5 dpf control y tratadas con netilmicina.	42
Figura 14. Fotomicrografía de anatomía cráneo-facial de larvas de pez cebra 5 dpf control y tratadas con amikacina.	42
Figura 15. Cortes transversales de larvas control y tratadas con amikacina 48 horas de exposición.	44
Figura 16. Cortes histológicos de larvas control y tratadas con amikacina 48 horas de exposición. Reacción de TUNEL.	45
Figura 17a. Concentración de fosfatasa alcalina en U/L en larvas de pez cebra control y tratadas	46
Figura 17b. Concentración de iones en mg/dl en larvas de pez cebra control y tratadas.....	46
Figura 18. Diferencia en el área de desplazamiento de las larvas control y tratadas.....	48
Figura 19. Neuromastomas de la porción caudal de las larvas del pez cebra control y tratadas. Tinción con DiOc1.....	49

I. INTRODUCCION.

El presente trabajo se enmarca dentro de la línea de investigación que desarrolla el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Instituto Anatómico “José Izquierdo”; cuyo objetivo general, es el estudio de señales tóxicas inducidas por compuestos químicos, fármacos o contaminantes sobre los diferentes sistemas, órganos, tejidos y células, que componen las unidades morfo-funcionales de vertebrados superiores e inferiores.

Una destacada unidad morfo-funcional en vertebrados superiores como los peces, lo constituye el sistema óseo. Es un sistema, esencialmente biomecánico, con funciones importantes como la de dar protección y soporte al cuerpo así como dar origen a procesos, como la hematopoyesis. Dicha morfo-funcionalidad, lleva a que cualquier alteración pudiera dar paso a una serie de patologías de relevancia en salud pública, siendo importante mantener el equilibrio entre la mineralización y el remodelado óseo ⁽¹⁾.

Como es sabido, el sistema óseo como unidad morfo-funcional, es altamente sensible a estresores químicos o metabólicos, lo cual lo hace un indicador idóneo para estudiar la actividad y/o alteración en los Núcleos de Mineralización Ósea (NMO) que los constituyen (Fig.1). Los NMO como elemento fundamental en la conformación del sistema óseo, se caracterizan, por ser centros conformados por células preosteoblásticas y osteoblásticas, moduladas por ricas matrices de señalización extracelular y de deposición mineral, mediante los cuales, se constituyen los centros de origen de los tejidos denso del hueso del esqueleto de los vertebrados ^(2,3,4).

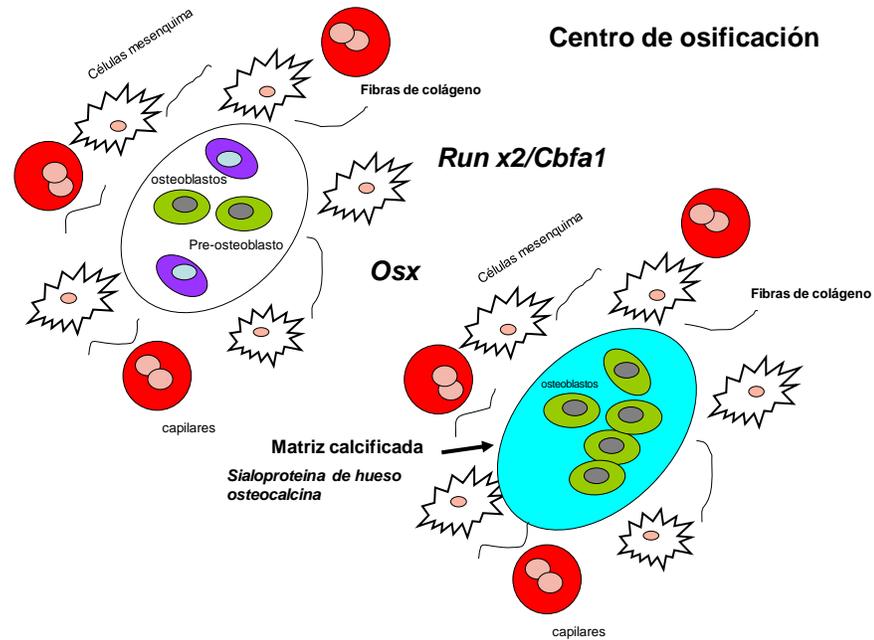


Fig.1. Representación esquemática de los Núcleos de Osificación. Se muestra la formación de Núcleos de osificación con participación de factores de señalización, se destaca *Runx2* y *Osx* entre otros elementos que conducen el proceso como la sialoproteína, osteocalcina, fibras de colágeno⁽⁵⁾.

Dentro de los agentes estresantes, que pueden alterar las matrices o núcleos de mineralización ósea, se encuentran aquellos fármacos que independientemente de su acción terapéutica pueden tener acción sobre esta unidad morfo-funcional, una acción bien sea directa o indirecta, ejercida a través de efectos secundarios o nocivos, que contraponen los riesgos potenciales a los beneficios del paciente. Dentro de estos agentes estresantes, cabe destacar la existencia de los aminoglicósidos (AGs), agentes químicos bactericidas que independientemente de su blanco terapéutico, pueden ejercer efectos secundarios o nocivos sobre otras unidades morfo-funcionales bastante conocidas como el sistema auditivo y el riñón, y otras unidades no tan conocidas, como es el caso del sistema óseo, y que definen su potencialidad tóxica, bien sea ototóxico, nefrotóxico y osteotóxica, entre otras^(6,7)

Al respecto, cabe destacar que desde hace pocos años, la posible relación entre los AGs y su no tan conocida acción sobre unidades morfo-funcionales como el sistema óseo, ha sido considerada. Así, estudios *in vitro*, han reportado una disminución de enzimas marcadoras de la diferenciación osteogénica con una concomitante disminución en la actividad de los osteoblastos ⁽⁸⁾. Sin embargo, la osteotoxicidad como fenómeno vinculado a la acción de los AGs no ha sido claramente establecida. Esta situación ha motivado la búsqueda de modelos experimentales eficientes, que permitan dar respuestas ante el poco conocimiento de la acción de los AGs sobre el tejido y la célula ósea.

En los últimos años ha surgido el pez cebra, *Danio rerio*, como modelo vertebrado por excelencia, para investigaciones de índole toxicológico. Estudios recientes sobre su morfogénesis, han indicado que durante su desarrollo, ocurren señales que involucran procesos similares a los observados en la diferenciación de los huesos y los cartílagos en mamíferos, lo que lo ubica como una alternativa para el estudio de la osteotoxicidad ^(9,10). Es por ello que, ante la necesidad de entender la etiología de los efectos tóxicos de compuestos químicos de relevancia terapéutica, como es el caso de los denominados AGs, el presente trabajo se propuso hacer uso de este importante modelo experimental para abordar *in vivo* el posible efecto osteotóxico vinculado con estos bien conocidos agentes terapéuticos bactericidas.

En el esqueleto o estructura ósea, tanto en el humano como en los peces (Fig.2), se destacan importantes centros de osificación a nivel de la porción cefálica, lumbar, extremidades inferiores y superiores, que se constituyen como centros regeneradores de

dicha estructura. Numerosos investigadores así lo han demostrado tanto en humanos como en modelos de experimentación ⁽¹¹⁾.

En humanos se ha dado gran relevancia a los centros de osificación de la mano de los cuales se ha descrito la secuencia de osificación ⁽¹¹⁾. En animales de experimentación ha sido posible demostrar alteraciones de los centros de osificación, particularmente la muerte celular necro-apoptótica en el tejido óseo de miembro inferior de embrión de pollo, con el uso de agentes estresantes como el agua carbonatada ⁽¹²⁾. Esta evidencia apoya la importancia que pueden tener estos centros de osificación para los estudios de las patologías óseas.

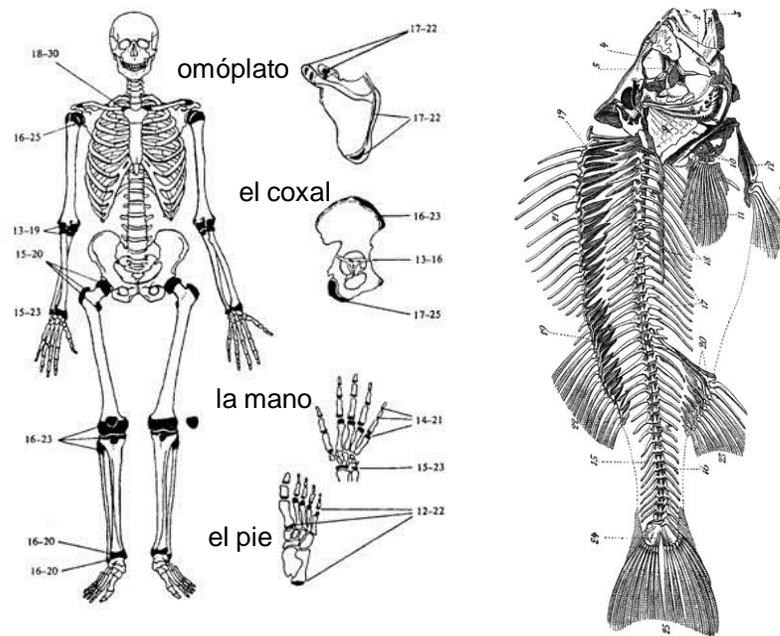
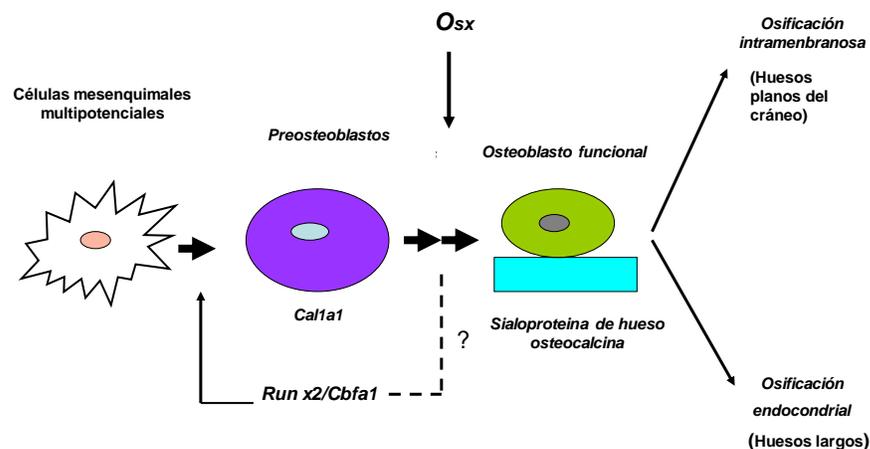


Fig.2. Estructuras óseas de humanos vs. peces. Se destaca los principales núcleos de osificación en el humano: el omóplato, el coxal, la mano, el pie; mientras que en los peces se encuentran en la cabeza, espina dorsal, cola ⁽⁵⁾.

Como unidad morfo-funcional, los NMO se caracterizan por numerosas células que definen el tejido óseo, entre las cuales se destacan las células mesenquimatosas multipotenciales, con alta capacidad de división, localizadas en las porciones internas denominadas periostios y endostios, que dan lugar a las células preosteoblásticas o progenitoras. Por otra parte, se encuentran los preosteoblastos, células provenientes de la alta diferenciación de las células multipotenciales y que van a dar origen a los osteoblastos funcionales o célula constituyente del tejido óseo ⁽¹³⁾. Todas estas células sintetizan la matriz del tejido óseo, promovido por cascadas de señalización osteogénica entre los que se destacan numerosos factores de vías de señalización intracelular como el Run X2, Cbfa1, Cal1a1 (Fig. 3) ⁽¹⁴⁾.



Modificado de Nakashima y col, 2002. *Cell* Vol.108,17-29

Fig.3. Representación esquemática de la cascada de señalización osteogénica. Se destacan las células mesenquimales con transformación a preosteoblastos y osteoblastos encargados de la osificación endocondrial e intermembranosa en donde intervienen factores de señalización como RunX2/cbfa1, sialoproteínas y osteocalcina ⁽⁵⁾.

Por último se destacan los osteoclastos, células cuya función principal es la reversión de la formación del hueso a través de la activación de enzimas lisosomales. El equilibrio entre las células osteogénicas y las células osteoclásticas da como resultado la estabilidad del tejido óseo, ya que proporcionan los niveles adecuados de compuestos inorgánicos y también la presencia de estructuras fibrilares que proporcionan la flexibilidad de dicha estructura.

Dentro de la mineralización inorgánica del hueso cabe destacar componentes como las sales de fosfato y calcio, entre otras, que contribuyen a la denominada remodelación ósea regulada por factores mecánicos y sistémicos⁽¹⁵⁾.

Dentro de las estructuras fibrilares se destacan las fibras de colágeno, las cuales se determinan la flexibilidad de la estructura ósea. Al respecto, es sabido que la síntesis y la secreción de los mucopolisacáridos, a cargo del aparato de Golgi de los osteoblastos, y la síntesis de colágeno vinculada con el retículo endoplásmico, se conjugan alrededor de los osteoblastos, constituyendo así la matriz ósea sobre la cual se depositan los compuestos inorgánicos para darle la dureza característica del hueso⁽¹⁶⁾.

Desde el punto de vista histológico (Fig.4), los núcleos de osificación podrían ser ubicados en el denominado cartílago hialino (flechas), un tejido definido como una estructura de células apiladas de manera intercalada de acuerdo a su polaridad (Fig.4 a'; a''; a'''), a través del cual se impulsa la formación y elongación de los primordios esqueléticos mediante señales que inducen la morfogénesis espacial y temporal de los

condrocitos, para dar forma a los primordios esqueléticos o núcleos de mineralización ósea⁽¹⁷⁾.



Fig. 4. Corte longitudinal de la larva control *Danio rerio* 5 dpf teñido con Azul de Toluidina. Se destaca la organización tisular del cartílago hialino (flechas). A mayor aumento la disposición de los osteoblastos en diferentes porciones de primordios esquelético (a'; a'', a''') con capa epitelioides de células intercaladas (a'), cuboides o cilíndricas bajas (a'', a'''); caracterizadas por poseer nucléolo único, muy desarrollado, situado con frecuencia en un extremo de la célula⁽⁵⁾.

Cabe destacar que estos primordios esqueléticos, tienen su origen en la cresta neural craneal. Entre el ectodermo y endodermo se origina el tejido mesodérmico, el cual después es invadido por células de la cresta neural, siendo éstas el mayor componente del mesénquima de los centros de osificación. Particularmente, en los teleósteos, este proceso es preponderante en el cartílago del esqueleto branquial, ya que desde las 24 horas post fecundación la cabeza esquelética es cartilaginosa, conocida como condrocráneo. Este a su vez, está compuesto por neurocráneo y vicerocráneo. El condrocráneo, está definido por porciones denominadas arcos, los cuales tienen origen endodérmico (pared faríngea, papilas gustativas), mesodérmico (músculo y endotelio

vascular), en la cresta neural (hueso, cartílago y tejido conectivo) y ectodérmico (epidermis y neuronas sensitivas de los arcos epibranchiales). De esta manera, un arco típico está constituido por un arco aórtico, un componente muscular, uno nervioso y un bastón cartilaginoso; siendo este último el constituyente del esqueleto de cada arco que, en conjunto, forman el llamado esqueleto branquial. Cada bastón cartilaginoso está constituido por una serie de hasta 5 elementos articulados, los cuales son: faríngeo-branquial, epibranquial, cerato-branquial, hipo-branquial y basibranquial (Fig.5). Los arcos se enumeran entonces como mandibular, hiomandibular y arcos branquiales los cuales son 5 en los peces teleósteos ⁽¹⁸⁾ (Tabla I).

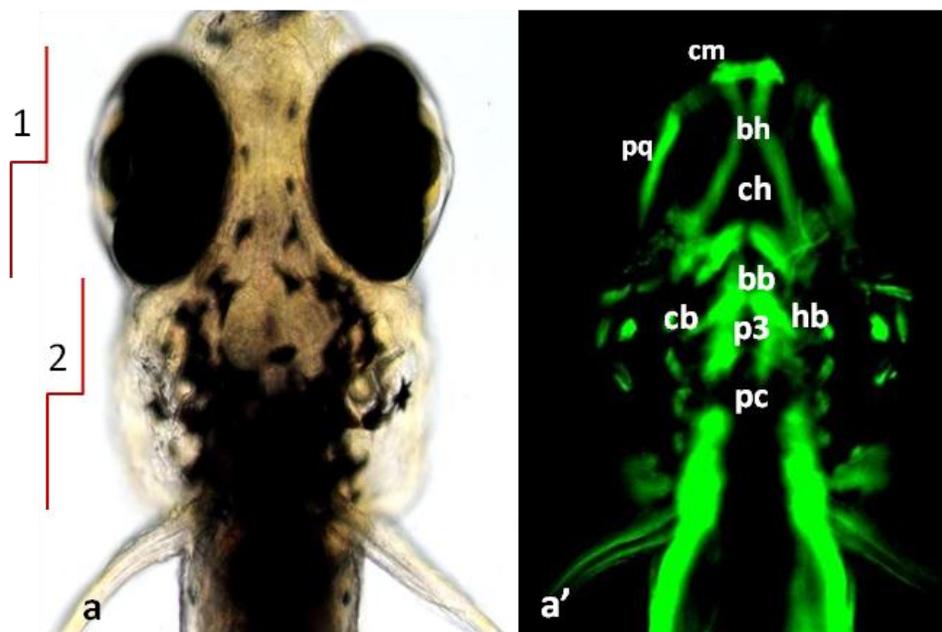


Fig.5. Núcleos de mineralización del esqueleto branquial de larvas de Pez cebra. Fotomicrografía in vivo, en posición ventral, de larva control 5 dpf no teñida (a), incubada con Calceina (a'). Se visualizan distintos elementos cartilagosos de **la porción cefálica (1)**: cartilago Meckel' (cm), palatoquadrate (pq), basihial (bh) y ceratohial (ch). **Porción branquial (2)**: p3, que incluye ceratobranchial (cb), hipobranchial (hb), basibranchial (bb) y paracardal (pc). La incubación con calceina 10 min, fue realizada posterior a una pre-incubación de 4 horas con Bromelina. Dr. Álvarez, Datos no publicados.

Tabla I. Algunos derivados de los arcos branquiales en peces teleósteos ⁽¹⁸⁾.

Modificado por Rivas Castillo Y. 2015.

Arco	Elementos cartilagosos branquial.
I. Mandibular	<ul style="list-style-type: none"> • Palatoc cuadrado • Cartílago de Meckel
II. Hiodeo	<ul style="list-style-type: none"> • Hiomandibular • Ligamento estilohioide • Ceratohial • Basihial
III	Cuerno mayor y porción caudal del cuerpo del hioideos
IV al V	Cartílagos laríngeos.

En los últimos años, el estudio de los núcleos de osificación ha sido abordado desde el punto de vista de la disminución de la densidad ósea; particularmente como un efecto secundario, consecuencia de la acción de algunos agentes farmacológicos como elementos estresantes ⁽¹⁹⁾. Así, ha sido evaluada la disminución de la densidad mineral ósea como un efecto secundario importante de varias clases de fármacos, que incluyen el tratamiento a largo plazo con glucocorticoides y en situaciones de cáncer de mama con el uso de inhibidores de la aromatasas ^(20,21). Sin embargo, hasta el presente los AGs no han sido relacionados con el estudio de alteraciones sobre estos centros de osificación.

I.a. Aminoglicósidos (AGs).

Los AGs (Fig.6), son sustancias químicas producidas por actinomicetos, *Streptomyces ssp.* y *Micromonospora ssp.*, que no se absorben por vía oral, pero se absorben rápidamente por vía intramuscular debido a su alta hidrosolubilidad. Estos fármacos actúan inhibiendo la síntesis de proteínas en las bacterias, después de ingresar a la célula mediante un sistema de transporte dependiente del oxígeno y de energía; por lo que se inhibe en condiciones de anaerobiosis ⁽²²⁾.

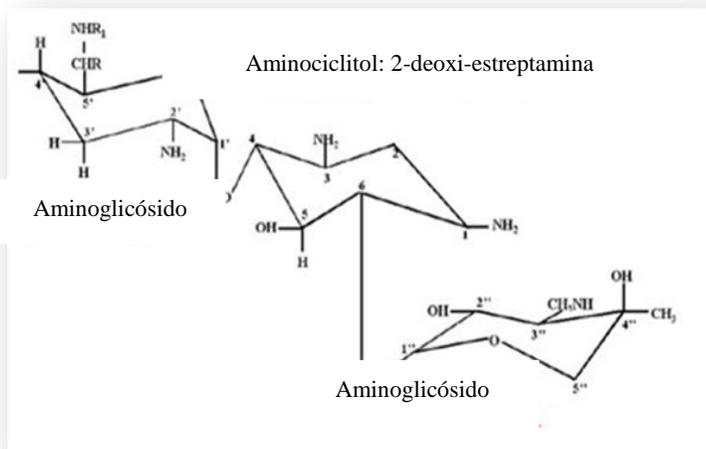


Fig.6. Estructura de un Aminoglicósido ⁽²²⁾.

Son, además, policationes cuya actividad antimicrobiana se ve favorecida en medios alcalinos; y reducida en medios ácidos, en anaerobiosis y en presencia de cationes bivalentes como el calcio, por lo que su uso amerita recomendaciones especiales tanto para administrar estos fármacos como para evitar o reducir los efectos adversos que producen ⁽²⁴⁾. Dentro de esta familia de los AGs, se encuentran compuestos que han sido

utilizados en la práctica clínica. Entre ellos, se encuentran: la estreptomicina, neomicina, gentamicina, tobramicina, amikacina, netilmicina, paromomicina, kanamicina y framycetina ⁽²⁵⁾. Entre ellas; amikacina, gentamicina y netilmicina, han sido utilizadas ampliamente para tratar infecciones causadas por bacilos Gram negativos, micobacterias, enterococos, y en tratamientos contra la *P. aeruginosa*, *Serratia*, *Enterobacter* y *Klebsiella*. Sin embargo su toxicidad y la resistencia han restringido su uso.

Por lo general, son administrados en combinación con β -lactámicos o glucopéptidos en las infecciones graves de tratamiento difícil, como la endocarditis bacteriana, o como parte de una “terapéutica ciega” para infecciones serias de etiología desconocida, en la cual una penicilina o una cefalosporina se combina con un AGs. Sin embargo, aunque no son tratamientos de primera línea, los AGs no han dejado de ser utilizados ⁽²⁶⁾.

I.a.1. Estructura química de los AGs.

Los antimicrobianos aminoglicósidos-aminociclitolos están constituidos por la combinación de 2 tipos de compuestos químicos: azúcares y alcoholes cíclicos, caracterizados cada uno como aminados y no aminados. Los azúcares aminados, son denominados aminoglicósidos, y los no aminados glucósidos; mientras que los alcoholes cíclicos aminados, son denominados aminociclitolos y los no aminados, ciclitolos. Esta combinación glucosídica entre los azúcares y los ciclitolos, es producto de la deshidratación de grupos hidroxilos continuos, dando como resultado los diferentes tipos

de antibióticos aminoglicósidos que se conocen. AGs como la gentamicina, amikacina y netilmicina, se encuentran ubicados dentro del mismo grupo de la 4,6 2-deoxiestreptamina, con una relación 2:1 azúcar/ciclitol ⁽²⁶⁾. (Tabla II)

Tabla II: Diferentes clases de Aminoglicósidos ⁽²²⁾. Modificado por Rivas Y. 2013.

Grupos principales	Relación ciclitol	Representantes	Azúcar/ciclitol
Aminoglucósido Aminociclitol	Estreptidina	Estreptomina	2:1
	4,5 2-deoxiestreptamina	Neomicina,	3:1
		Paromomicina, Ribostamicina,	
	4,6 2-desoxiestreptamina	Gentamicina Amikacina Netilmicina.	2:1
Glucósido aminociclitol	Actinamina	Espectinomicina	1:1
Aminoglucósido ciclitol	Hexahidrociclohexano	Kasugamicina	1:1

Ia.2 Toxicidad de los AGs.

Los AGs comparten el potencial de producir toxicidad, ampliamente estudiada y reportada, como la ototoxicidad ^(27,28,29,30) la nefrotoxicidad ^(32,33) y el bloqueo neuromuscular ^(34,35) con signos y síntomas como fiebre ⁽³⁵⁾, salpullido ⁽³⁵⁾, entre otros ^(36,37).

En términos generales, la nefrotoxicidad de los AGs ha sido fundamentada en algunos mecanismos conducentes a la disminución de la tasa de filtración glomerular, tales como: primero, la inhibición de la fosfolipasa C, lo cual inhibe la producción de las prostaglandinas vasodilatadoras, permitiendo la acción vasoconstrictora arteriolar ⁽³⁸⁾ y segundo, el aumento del factor activador de plaquetas (PAF), promotor de un efecto vasoconstrictor que provoca un descenso en la presión de ultrafiltración y por ende disminución de la tasa de filtración glomerular ^(39,40).

Algunos autores sugieren una posible interacción entre los AGs y la unión neuromuscular, ya que parte del mecanismo de acción a este nivel es calcio-dependiente inhibiéndose así la liberación de acetilcolina y ocasionando con ello parálisis neuromuscular, generado cuando se alcanzan concentraciones muy altas en la placa motriz. Una elevada concentración de calcio se produce, si el antibiótico se administra en inyección rápida intravenosa o si la absorción es muy rápida, como ocurre cuando se administran concentraciones elevadas de AGs en el líquido pleural o el líquido peritoneal ^(39,40).

Entre otras complicaciones, se han descrito reacciones de hipersensibilidad, que aparecen en ocasiones en sus distintas formas; llegando incluso a producir reacciones anafilácticas graves. Por vía oral, pueden provocar algunas molestias gastrointestinales; así como en el tratamiento crónico pueden llegar a causar un síndrome de malabsorción. También se ha descrito toxicidad en la retina causada por los AG, siendo del más tóxico

al menos tóxico la gentamicina > netilmicina = tobramicina > amikacina = kanamicina⁽³⁶⁾.

Aunque no se tiene seguridad absoluta sobre su posible acción teratógena, se piensa que podrían provocar en el feto una lesión ototóxica o nefrotóxica, por lo que su uso en mujeres embarazadas queda restringido a infecciones graves que no responden a otros antibióticos o a casos de hipersensibilidad a otros antibióticos^(34,43).

Desde hace algunos años se ha observado la posible relación entre el uso de los AGs y la ósteo-toxicidad; sin embargo, es ahora cuando los investigadores han dado importancia a este hecho, aun no quedando claro la relación osteotóxica ni el mecanismo involucrado en esta posible toxicidad ósea. Aun así, la toxicidad ósea podría ser un efecto secundario relevante, ya que *in vitro* se ha observado la disminución de la actividad de los osteoblastos, al aplicar localmente altas dosis de gentamicina sobre estas células, así como también ha sido observado el descenso de la fosfatasa alcalina, enzima marcadora que se expresa por la diferenciación osteogénica⁽⁴⁴⁾ Otros autores, sometieron una línea celular de osteocarsoma humana (MG-63) a concentraciones agudas de tobramicina, obteniendo como resultados, que a concentraciones menores de 200 µg/ml la tobramicina no produce inhibición de la replicación osteoblástica; sin embargo, a 400 µg/ml ocurre una disminución significativa de los osteoblastos y a 10.000 µg/ml causa muerte celular, resultados similares se obtuvieron con cultivos de osteoblastos de rata⁽⁴⁵⁾.

Las células de osteoblastos C2C12 fueron sometidas a una aplicación local de gentamicina a concentraciones de 12,5-800 $\mu\text{g/ml}$ durante 48 horas, y luego a una concentración de 200-800 $\mu\text{g/ml}$, a concentraciones menores de 800 $\mu\text{g/ml}$, no se observaron cambios significativos en el número de células, pero la viabilidad celular se redujo en un tercio a las concentraciones ensayadas entre 200-800 $\mu\text{g/ml}$. La actividad de la fosfatasa alcalina disminuyó significativamente en un tercio en cualquier concentración probada (12,5 a 800 $\mu\text{g/ml}$) de gentamicina. Sin embargo, la exposición a una concentración de gentamicina de 800 $\mu\text{g/ml}$ por 48 horas no inhibe ni disminuye la expresión del gen osteogénico osterix (factor de transcripción clave de los osteoblastos) ni fosfatasa alcalina. Por lo tanto, en este trabajo se concluyó, que la gentamicina a altas concentraciones reduce la viabilidad celular y la actividad de la fosfatasa alcalina *in vitro*; sin embargo, *in vivo* podría mejorar la reparación del hueso. Otras investigaciones han mostrado los beneficios del uso de netilmicina 50 mg en el tratamiento de pacientes con artroplastia; así como también han puesto en evidencia la disminución de la fosfatasa alcalina, de la 3 H-timidina y del ADN en cultivo de células osteoblásticas humanas cuando son expuestas a la gentamicina durante 4 días, con una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ ^(7,46,47).

Investigadores en 2006 demostraron que la netilmicina, otro antibiótico perteneciente a la categoría de los AGs, produce inhibición de la actividad enzimática de la biosíntesis del colágeno en cultivos de fibroblastos de piel de humanos a concentraciones <5 $\mu\text{g/ml}$. El colágeno es el principal componente de la matriz ósea. En otro estudio se demostró que este AGs produce una rápida disminución de la línea lateral de los neuromastomas en el modelo larvario de pez cebra dependiente de la

concentración a los 90 minutos ^(48,49).

Por lo documentado hasta ahora, existe una relación entre los aminoglicósidos y el tejido óseo; sin embargo, esta relación, según algunos investigadores, es beneficiosa y para otros contradictoria, observándose por lo general, que a bajas concentraciones se inducen beneficios, ocurriendo lo contrario a altas dosis o en tratamientos prolongados. Esta contradicción, ha incentivado la búsqueda de modelos experimentales que permitan profundizar y dar respuesta ante el poco conocimiento de la acción de los AGs sobre el tejido y la célula ósea.

I.b. El Pez Cebra Como Modelo Experimental

Es sabido que el pez cebra *Danio rerio*, muestra una amplia similitud con los seres humanos en términos de la arquitectura ósea, las células óseas, las proteínas de matriz y la señalización molecular ^(50,51), (Tabla III). Por ejemplo, el gen *sox9a* (necesario para la condrogénesis), controla la expresión del gen *col2A1* que codifica para el colágeno tipo II, que es el principal tipo de colágeno en el cartílago. La pérdida de la función del gen *RunX2a*, no tiene ninguna influencia en la condrogénesis craneal en el pez cebra *Danio rerio*; en cambio, el gen *Runx2b* juega un papel clave en la maduración de los condrocitos y en la diferenciación osteoblástica. La señalización de las proteínas morfogénicas óseas (BMPs por sus siglas en inglés), juega un papel esencial para la diferenciación y maduración de los condrocitos y osteoblastos, especialmente durante la osificación endocondral. Entre los ligandos BMPs, que estimulan la diferenciación de los

osteoblastos y condrocitos se encuentran: BMP2, BMP4, BMP7 y BMP6. Varios estudios en ratones han demostrado que las BMPs regulan factores de transcripción tales como: *Runx2*, *osterix*, *MASX2* y *Sox9*, cruciales para el cartílago y la formación del hueso. Se ha demostrado, que la proteína BMP2, está involucrada en la inducción de la diferenciación del hueso, durante la regeneración de las aletas. Otros grupos de investigadores, han demostrado que moléculas del factor transformante de crecimiento, incluyendo la BMP2, son efectivas en promover la condrogénesis y la osteogénesis *in vivo* en vertebrados superiores, incluyendo los humanos ^(52, 53, 54).

Tabla III. Comparación de los genes existentes en peces, aves y mamíferos ⁽⁵²⁾.

	<i>col 1</i>	<i>col 2</i>	<i>col 10</i>	<i>col 11</i>	<i>sox9</i>	<i>runx2</i>
<u>Condrocitos</u>						
Teleósteos	-	+	+	+	+	+
Aves	-	+	+	+	+	+
Mamíferos	-	+	+	+	+	+
<u>Osteoblastos</u>						
Teleósteos	+	+	+	+	+	+
Aves	+	-	-	+	-	+
Mamíferos	+	-	-	+	-	+

Por lo tanto, el pez cebra *Danio rerio*, representa un modelo útil para analizar el comportamiento de los osteoblastos durante su formación y mineralización, así como también sus características únicas representan una ventaja para estudios fisiológicos y pruebas farmacológicas. Las ventajas como modelo experimental que presenta este

vertebrado, ha permitido estudiar la biomineralización, por lo que en diferentes universidades de reconocido prestigio, como la Universidad de Harvard, han desarrollado protocolos para estudiar la embriología del pez cebra *Danio rerio*, aportando a la ciencia resultados fiables, reproducibles y con un mínimo costo de reactivos, usando técnicas de coloración para observar las etapas del desarrollo de este modelo ⁽⁵⁵⁾. Estas técnicas, también han sido usadas por otros investigadores para poner en evidencia la mineralización *in vivo* a través de Rojo de Alizarina, así como también tinciones histoquímicas como Azul de Alcían y Von Kossa para evidenciar los núcleos de mineralización.

También se han usado técnicas de coloración para observar núcleos de mineralización en otros estudios, como por ejemplo, en 2010 en Venezuela, se analizaron fetos humanos a través de la tinción de alizarina, demostrándose que a partir de la novena semana de gestación comienzan a aparecer núcleos de osificación en la región del ala mayor del esfenoides y a las onceava semanas se observan núcleos de osificación, siendo la semana 12 de vida intrauterina cuando comienza la osificación en el pterigoideo ⁽⁵⁶⁾, por lo que el desarrollo endocondral empieza desde las primeras etapas de la gestación. Es por esta razón que los fetos son sumamente sensibles a cualquier agente químico, como por ejemplo los fármacos, ocurriendo de la misma manera en el pez cebra donde el desarrollo óseo comienza desde temprana edad (24 horas), pudiéndose observar estructuras óseas y otros órganos a los 5 días post fecundación ^(57,58).

Estas características del pez cebra *Danio rerio* han permitido incluirlo entre los

posibles modelos para el estudio de alteraciones óseas, destacándose en investigaciones de índole toxicológico, por las ventajas que éste presenta; mide entre 3 y 6 cm de largo aproximadamente en la edad adulta (siendo las hembras de mayor tamaño), posee características ventajosas como son: la puesta de cientos de huevos diarios, la transparencia de sus embriones (que permite que puedan ser observados durante el desarrollo fuera del adulto); a los 5 días post fecundación (dpf) se pueden distinguir estructuras de órganos y ser observadas al microscopio. Estas características hacen eficiente su uso en los estudios de la toxicidad de sustancias que pueden ser absorbidas del medio en que se mantiene esta especie. El mantenimiento es de bajo costo, tienen un corto tiempo de generación, y al ser un vertebrado presenta gran correlación con los modelos de mamíferos con aproximadamente un 70% de similitud con el genoma del ser humano ^(58,59). Además, evita los problemas éticos/legales de los roedores (no es considerado un animal de laboratorio por las Directivas de la Unión Europea) y satisface el criterio de las 3Rs: Reducir, Refinar y Reemplazar) y tiene actualmente más de 4000 investigadores alrededor del mundo usando este modelo experimental, sobrepasando los 10000 artículos científicos en PubMed actualmente. Es un pez pacífico pero de rápidos movimientos que nada constantemente, necesitando espacio y abundancia de oxígeno, un pH de 7,0-7,8 y una temperatura entre 18 y 26°C. Habita en ríos con corrientes rápidas y se ubica en Asia (específicamente en Pakistán, India, Bangladesh y Nepal) ^(60,61).

La reproducción es de las más sencillas que se puede encontrar en especies ovíparas. Los huevos son liberados por la hembra en el agua y son inmediatamente fecundados por los machos. No son nada adhesivos por lo que caen al fondo del acuario; es por ello que para protegerlos de que los padres los ingieran es recomendable colocar

una malla protectora en el fondo de la pecera. Una vez fecundados los huevos se da inicio a una serie de periodos que corresponden a las divisiones celulares necesarias para dar paso a un nuevo individuo. En 24 a 48 horas se observaron los primeros rudimentos de órganos internos de los distintos aparatos y el esbozo de cola, incluso el corazón empieza a latir, ocurriendo la eclosión al tercer día post-fecundación (3dpf), obteniéndose así una larva temprana (Fig. 7a). Una vez formadas todas las estructuras y sistemas será una larva juvenil y luego un adulto (Fig. 7b), considerándose adulto a partir de los tres meses, período en que comienzan a alcanzar la madurez sexual ⁽⁶²⁾.

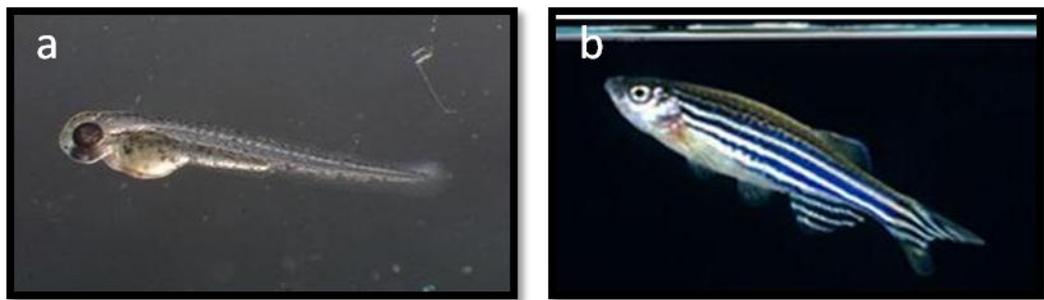


Fig. 7. Pez Cebra: **a.** Larva temprana. **b.** Adulto ⁽⁵⁸⁾.

Todo lo anteriormente expuesto y la necesidad de entender la etiología de los efectos tóxicos de agentes químicos de uso terapéutico, como los AGs y su posible acción osteotóxica y contando con un modelo experimental idóneo, incentivó la investigación ha objeto de poner en evidencia si la gentamicina, la netilmicina y la amikacina, producen alteraciones sobre los núcleos de mineralización ósea en las larvas de pez cebra *Danio rerio*. La presente investigación aportaría información de interés clínico, que permita pronosticar y evaluar el riesgo/beneficio del uso de estos antibióticos, según el tipo de

paciente y discernir sobre la administración de estos compuestos, ya que podría producir alteraciones óseas aun no descritas.

II. Objetivos

II.a.1. Objetivo General

Estudiar el efecto ósteo-tóxico “*in vivo*” inducido por la gentamicina, la netilmicina y la amikacina sobre el modelo experimental larvario del pez cebra (*Danio rerio*).

II.a.2. Objetivos Específicos

1. Determinar la toxicidad *in vivo* de los aminoglicósidos seleccionados en larvas del pez cebra *Danio rerio*.
2. Demostrar los posibles cambios producidos a nivel histoquímico por los aminoglicósidos sobre los núcleos de mineralización en el tejido óseo de larvas de pez cebra *Danio rerio*.
3. Evaluar los posibles cambios inmunohistoquímicos en los núcleos de mineralización ósea del tejido larvario de pez cebra *Danio rerio*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.a. Obtención de huevos y larvas de pez cebra *Danio rerio* 5 días post fecundación (5dpf).

Los huevos y las larvas de pez cebra utilizados en los distintos ensayos de biotoxicidad en esta investigación, fueron obtenidos a partir de peces adultos hembras y machos de tipo silvestre (wt), proveniente de casa comercial, tienda “Las Mascotas” Santa Mónica. Previo a la incorporación de los peces al acuario, se requirió un proceso de adaptación evitando cambios bruscos de ambiente. En primer lugar, se introdujo el medio de transporte cerrado de los peces (empaque plástico) dentro del acuario, a fin de equilibrar la temperatura dentro del medio de transporte con el agua del acuario; luego de 5 minutos, se procedió a abrir el medio de transporte para favorecer el intercambio gaseoso con el ambiente. Seguidamente, se agregaron aproximadamente 200 ml de agua del acuario dentro del medio de transporte, se dejó reposar durante 10 minutos (procedimiento que se repitió dos veces más); se observó el comportamiento de los peces ya que se estaba cambiando la temperatura, el pH y los nutrientes del ambiente. Transcurrida media hora del contacto de los peces con el agua del acuario, con la ayuda de una malla los peces fueron posteriormente liberados en el acuario. Los peces fueron mantenidos en el laboratorio en un acuario de vidrio de 120 cm de largo x 50 cm de profundidad x 30 cm de alto, provisto de un filtro interno de carbón activado y un aireador para la oxigenación del agua. Los peces fueron alimentados tres veces al día con alimento en hojuelas para peces (Kantal S.A.). Transcurridos 20 días de acondicionamiento de los peces, los mismos fueron seleccionados para la realización de los bioensayos.

Posterior al período de acondicionamiento de 20 días, la postura de huevos fue inducida luego de un ciclo de luz-oscuridad de 16 y 8 horas respectivamente, con lámparas de 11 vatios FLC (lámparas fluorescentes compactas), manteniéndose una temperatura entre 21 y 25°C. Una vez que las hembras liberaron los huevos en el agua, los mismos fueron fecundados por los machos. Debido a que los huevos no son adhesivos, caen libremente y se depositaron en una malla que se encontraba en el fondo del acuario, evitando así que fuesen consumidos por los peces adultos. Los huevos se obtuvieron en tandas de 150-300 por día, fueron extraídos, lavados y colocados en Placas de Petri, y luego fueron incubados a 28°C hasta los 5 días post-fecundación (5 dpf) estadio necesario para los ensayos de biotoxicidad ⁽⁶³⁾.

III.b. Bioensayo de toxicidad de la gentamicina, netilmicina y amikacina sobre la población larvaria 5dpf .

Para calcular la Concentración Letal Media (CL₅₀) de los aminoglicósidos seleccionados, se procedió a realizar una curva dosis-respuesta, para conocer la concentración de la gentamicina, la netilmicina y la amikacina, que causaba el 50% de mortalidad en los organismos expuestos a las 24, 48 y 72 horas. Para ello se utilizaron antibióticos comerciales en presentación en discos de concentraciones, conocidas y exactas de cada uno de los aminoglicósidos (netilmicina 30 µg, gentamicina de 10 µg y 120 µg, y amikacina de 30 µg); concentraciones de 0, 15, 30 y 60 µg/ml para cada antibiótico se ensayaron por triplicado. Los ensayos respectivos fueron realizados en placas de 24 pozos, con un número de 10 larvas/pozo/concentración en un volumen final de 2000 µl de agua de pecera filtrada a temperatura ambiente.

Transcurridos los diferentes tiempos de tratamiento (24, 48 y 72 horas) se procedió a determinar el porcentaje de mortalidad y a calcular la concentración letal media (CL₅₀) por el método de Spearman-Kärber ⁽⁶⁴⁾, siguiendo las fórmulas reseñadas. La estimación de la CL₅₀ permitió estimar la CT₅₀ y los intervalos sub-letales y supra-letales de los antibióticos estudiados con un intervalo de confianza del 95%.

$$CL_{50} = m - XK - d (S1 - 1/2)$$

Donde:

XK= dosis mínima a partir de la cual la mortalidad fue 100%.

d = intervalo entre cada dos dosis.

S1= suma de las fracciones de individuos que presentaron muerte.

La desviación estándar SCL₅₀, o más fácil Sm, se determina mediante la siguiente ecuación:

$$Sm = (2S2 - S1 - S12 - 1/12)^{1/2}$$

Dónde, S2 = suma de la fracción acumulada de los individuos que presentaron la muerte ⁽⁶⁴⁾.

Además del método Spearman-Kärber se utilizó el método Probit, un método paramétrico que permite relacionar una variable independiente (concentración del tóxico) y una variable dependiente (respuesta=mortalidad). Para ello fueron definidos los

siguientes parámetros ⁽⁶⁵⁾:

- a) Logaritmo de Concentración de cada uno de los antibióticos (gentamicina, netilmicina y amikacina).
- b) Valor probabilístico del evento ocurrido (Valor Probit).

III.c. Señales de ósteo-toxicidad.

III.c.1. Núcleos de osificación.

Como primera señal específica de ósteo-toxicidad inducida por los aminoglicósidos ensayados, se seleccionó el cambio en los parámetros morfo-anatómicos como la estructura cráneo-facial de las larvas de pez cebra *Danio rerio* control y tratadas así como los cambios en la arquitectura ósea. Los cambios en la estructura cráneo-facial fueron registrados mediante observaciones directas bajo el Microscopio Estereoscópico Olympus BX50 y registrados en fotomicrografías tomadas con Cámara Fotográfica Digital Olympus DP71, proveniente de Japón incorporada al microscopio. Las fotomicrografías fueron analizadas cualitativa y semi-cuantitativamente con ayuda del programa de análisis de imagen ImageJ, programado en Java desarrollado en el Instituto Nacional de Salud de EEUU.

Por otra parte, con respecto a la arquitectura ósea, se analizaron los cambios producidos a nivel de los principales centros de osificación de la porción cráneo-facial de las larvas de pez cebra *Danio rerio* de 5dpf, tales como la región arco mandibular, arco

hioideo y la porción cerato-branquial. Dichos centros, fueron visualizados con el uso del Rojo de Alizarina, un colorante derivado de la antraquinona obtenido por la oxidación del antraceno y que permite evidenciar la mineralización de dichas zonas con la presencia de depósitos de calcio ⁽⁶²⁾. Una vez transcurrido el tiempo de exposición (48 horas) a las concentraciones sub-letales de los aminoglicósidos utilizados, las larvas control y las tratadas fueron incubadas con una solución de Rojo de Alizarina al 0,5% durante 24 horas a temperatura ambiente y en la oscuridad. Posteriormente, las larvas fueron lavadas en agua de pecera y colocadas en un soporte de agarosa 2% (Sigma Ha-9915) para ser observadas bajo el Microscopio de Fluorescencia Olympus IX71, a una longitud de onda de excitación entre 535 y 555 nm. Los cambios producidos en la mineralización fueron registrados fotográficamente y analizados a través de histogramas de densidad realizados con el programa de análisis de imagen ImagenJ.

III.c.2. Análisis Histoquímico e Inmunohistoquímico.

Preparaciones de las larvas control y tratadas a las concentraciones sub-letales de los diferentes aminoglicósidos ensayados, fueron analizadas desde el punto de vista histológico. Para ello, una vez transcurrido el tiempo de tratamiento con los respectivos aminoglicósidos, ambos grupos fueron fijados en solución de Karnovsky ⁽⁶⁶⁾ (Glutaraldehído 25% - paraformaldehído 25% en medio acuoso), durante 24 horas a 4 °C. Tras la fijación, se procedió a la deshidratación de las muestras en concentraciones crecientes de etanol 70,80, 90, 100%, finalizando con una desalcoholización en xilol, por 15 minutos. Seguidamente, las muestras fueron embebidas en parafina, para finalmente

ser incluidas en posición ventral, para la obtención de bloques a ser cortados en secciones transversales de la estructura anatómica de las larvas control y las tratadas. Cortes de 0,4µm fueron realizados utilizando micrótomo RM2255 Leica Microsystems de EEUU y coloreados con Azul de Toluidina al 1% durante 1 minuto. Este es un colorante metacromático que tiene afinidad por las estructuras ricas en proteoglicanos presentes en el cartílago. Los cortes fueron fotografiados con un Microscopio Olympus IX71, con lo cual se pudo obtener registros fotográficos que permitieron analizar los cambios expresados a nivel de núcleos de mineralización y otros tejidos. Dichos cambios fueron determinados a través del establecimiento de las diferencias en la arquitectura celular de los osteoblastos con un análisis semi-cuantitativo de densidad óptica y una tinción diferencial con Azul de Alcian 0,1% a pH 2,5. El posible mecanismo de muerte celular asociado a los cambios experimentados por los osteoblastos, se determinó mediante la tinción inmunohistoquímica de TUNEL.

EL Azul de Alcian, es un colorante catiónico usado para la determinación de glicosaminoglicanos presentes en la matriz extracelular del tejido conjuntivo y del tejido óseo. Cortes histológicos de la porción cráneo-facial fueron incubados durante 30 minutos en solución filtrada de Azul de Alcian, luego fueron lavados con agua corriente durante 10 minutos y enjuagados con agua destilada, para luego ser contrastadas con una solución filtrada de Rojo Núcleo resistente durante 5 minutos. Luego las muestras fueron enjuagadas con agua destilada por 1 minuto y finalmente fueron deshidratadas y aclaradas pasándolas por alcohol etílico al 95%, alcohol absoluto y por último xileno, realizando esta deshidratación creciente de alcoholes 2 veces cada una durante 2 minutos, y luego fueron observadas al microscopio en medio resinoso.⁽⁶⁷⁾

La desoxinucleotidiltransferasa Terminal marcado con dUTP (TUNEL), es una tinción inmuno-histoquímica fundamentada en la identificación de fragmentos de ADN provenientes de células dañadas. La presencia de fragmentos de ADN puede ser identificada por la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), una enzima que cataliza la adición de dUTPs, etiquetados con un marcador fluorescente que puede también marcar las células que han sufrido daños en el ADN ⁽⁶⁸⁾. Esta reacción se llevo a cabo sometiendo los cortes histológicos de muestras control y tratadas, al protocolo descrito en el kit Colorimétrico, The DeadEnd™ de USA, adquirido de la Casa Comercial Promega de Alemania. Este protocolo consistió en realizar un pre-tratamiento de las muestras, desparafinando con xilol durante 5 minutos. Luego fueron sumergidas las muestras en etanol al 100% durante 5 minutos y rehidratadas con una batería de alcoholes en concentraciones decrecientes: 95%, 85%, 70%, 50%, dejándolas en contacto con cada concentración de alcohol a temperatura ambiente (T.A) por 3 minutos. Posteriormente, las muestras fueron sumergidas en solución de cloruro de sodio al 0,85% y luego en buffer fosfato salino pH 7,4 (PBS) durante 5 minutos cada una. Seguidamente, se realizó la detección de la apoptosis, fijando las muestras pre-tratadas en paraformaldehído al 4% a T.A durante 15 minutos. Luego las muestras fueron lavadas en PBS durante 5 minutos; se permeabilizó el tejido agregando 100 µl de una solución de 20 µg/ml de proteinasa K e incubándolo a temperatura ambiente durante 10-30 minutos. Luego fueron sumergidas en PBS durante 5 minutos y se repitió la fijación en paraformaldehído al 4% en PBS a T.A durante 5 minutos, se retiró el exceso de líquido y se colocó en 100 µl de mezcla de reacción IDTE (Nucleótido biotinilado recientemente preparado y mantenido en hielo) el cual se prepara con 98 µl de buffer equilibrado con PBS + 1 µl de nucleótido biotinilado

+ 1 μ l rTdT. Posteriormente, se agregó 100 μ l de tampón equilibrado pH 7,4 y se incubó a temperatura ambiente durante 5-10 minutos. A continuación, se agregó 100 μ l de la mezcla de reacción de TdT (terminal desoxinucleotidil transferasa) a las preparaciones de tejidos, evitando que los cortes de los mismos se secan por completo; se cubrió las preparaciones con láminas cubreobjetos de plástico para asegurar una distribución uniforme de la mezcla; las preparaciones fueron incubadas a 37°C durante 60 minutos en una cámara húmeda, para permitir que se produzca el marcaje en los extremos de los fragmentos de ADN. Transcurrido este tiempo se detuvo la reacción removiendo la lámina cubreobjetos y sumergiendo la preparación en una solución 2 veces la concentración de cloruro de sodio en citrato de sodio (SSC), la cual proviene de una dilución 1:10 SSC con reactivo 20X (20 veces la concentración) suministrado por la casa comercial, a T.A durante 15 minutos. Seguidamente, se lavó tres veces en PBS a T.A durante 5 minutos, para eliminar los nucleótidos biotinilados no incorporados al ADN. Luego se sumergieron las muestras en peróxido de hidrógeno al 0,3% durante 3-5 minutos para bloquear las peroxidasas endógenas, se realizaron 3 lavados por inmersión con PBS a T.A durante 5 minutos. Luego se agregó 100 μ l de estreptavidina HRP (peroxidasa de rábano marcada con estreptavidina) diluida 1:500 en PBS, luego se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente se lavó 3 veces en PBS durante 5 minutos. Para visualizar la reacción, se agregó 100 μ l de la solución diaminobenzidina (DAB) (recientemente preparada) y se dejó actuar hasta que apareció un fondo marrón claro, evitando que el fondo de la preparación se tornara demasiado oscuro (aproximadamente 10 minutos); seguidamente la preparación se sumergió varias veces en agua desionizada. Finalmente, para visualizar la preparación se colocaron las muestras en un medio de montaje (100% glicerol) y se observó la tinción en

un Microscopio de luz Olympus IX71.

III.c.3 Análisis Bioquímico.

La actividad enzimática del macerado de larvas de pez cebra controles y tratadas fue analizada desde el punto de vista bioquímico. Para ello, una vez transcurrido el tiempo de tratamiento con los respectivos aminoglicósidos, se preparó un macerado de 10 larvas/100 μ L de agua de pecera filtrada y se determinó la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina y la concentración de iones calcio y fósforo a través de métodos enzimáticos y colorimétricos, respectivamente ⁽⁶⁹⁾.

La medición de la actividad de la fosfatasa alcalina total, es una determinación cinética de la enzima que involucra la hidrólisis del 4-Nitrofenilfosfato, formando 4-nitrofenol y fosfato inorgánico. La proporción a la cual forma 4-nitrofenol es directamente proporcional a la actividad de la fosfatasa alcalina. Para ello, se hizo uso de un equipo automatizado marca Chenweell® 2910 procedente de los Estados Unidos. Se lleva el reactivo a temperatura 37°C incubando 1 ml de reactivo de la casa comercial Stambio durante 3 minutos. Una vez atemperado el reactivo, se agregan 20 μ L del macerado de larvas y se lee la absorbancia cada 60 segundos durante tres minutos a 405 nm. Los valores de la fosfatasa alcalina se derivan en base al coeficiente de extinción de absortividad micromolar del 4-nitrofenol a 405 nm. La actividad de la fosfatasa alcalina se expresa en unidades por litro (U/L), la cual es la cantidad de enzima que produce 1 nmol/L de 4-nitrofenol por minuto ⁽⁶⁹⁾.

En la determinación bioquímica del calcio inorgánico se usa un método colorimétrico, el cual se basa en hacer reaccionar el calcio con arsenazo III, dando un

complejo azul que se mide fotocolorimétricamente a 650 nm. Para ello, se hizo uso de un equipo automatizado marca Chenweell® 2910, el cual una vez calibrado aspira 1 ml de reactivo colorimétrico directo marca Winner y 10 µL del macerado de larva, se mezcla y se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 2 minutos, para luego ser leído a 650 nm ⁽⁷⁰⁾. Para la determinación del fósforo inorgánico, se hace uso de una reacción colorimétrica, la cual se basa en hacer reaccionar el fósforo con un componente de molibdato. Este se transforma en un complejo molibdeno pentavalente que es de color azul, el cual se lee a una longitud de onda de 340 nm. Para ello, se hizo uso de un equipo automatizado Chenweell® 2910; el cual aspira 1 ml de reactivo de la casa comercial Chemroy con 10 µL de macerado de larvas, mezcla y deja estabilizar la reacción durante 1 minuto a temperatura ambiente para posteriormente ser leído a 340 nm ⁽⁷¹⁾.

III.d. Señales Generales de Acción Tóxica:

III.d.1. Actividad motora. ⁽⁷²⁾

Dentro de los parámetros a ser definidos como efecto tóxico sub-lethal ante la acción de los antibióticos evaluados sobre la población larvaria de pez cebrá, fue seleccionado el cambio en la actividad motora como señal de acción tóxica. Para la evaluación de tal efecto, se monitoreó la actividad motora de las larvas de pez cebrá *Danio rerio* de 5 dpf, tanto controles como tratadas, durante los tiempos respectivos de tratamiento. Dicho monitoreo, fue llevado a cabo haciendo uso de video-registros realizados a través de un programa de captura de video DP- Controller, Soft Imaging System Olympus Cell Family (Alemania); incorporado a un microscopio Olympus IX71, modelo IX71S1F3 (Japón); durante 1 minuto de duración del movimiento de las larvas.

Los videos, fueron analizados haciendo uso del programa Tracker construido sobre una plataforma Java Open Source Physics (OSP), el cual permitió calcular el tiempo de desplazamiento y el área del recorrido, obteniéndose así la variación de velocidad del desplazamiento, como parámetro de cambio de la actividad motora ⁽⁷²⁾.

III.d.2. Cambios Morfológicos.

Otra señal de respuesta tóxica sub-letal, fue el cambio en la morfo-anatomía de las larvas control de pez cebra *Danio rerio*, y en aquellas expuestas a las distintas concentraciones de los antibióticos evaluados. Dichos cambios fueron realizados a través de observaciones directas bajo el Microscopio Estereoscópico Olympus BX50, modelo BX50F-3 proveniente de Japón; y registrados en fotomicrografías tomadas con Cámara Fotográfica Digital Olympus DP71, proveniente de Tokio-Japon, incorporada al microscopio. Las fotomicrografías fueron analizadas cuali y semi-cuantitativamente con ayuda del programa de análisis de imagen ImageJ, programado en Java desarrollado en el National Institutes of Health, en EEUU ⁽⁷²⁾, haciendo énfasis sobre las características del eje vertical de la larva, así como sobre la organización de estructuras sensoriales, visiblemente expuestas con el uso de sondas fluorescentes como el DiOC1. El DiOC1, es un marcador fluorescente usado como colorante vital para evidenciar *in vivo* organelos sub-celulares. Este marcador fluorescente, fue preparado a una concentración final de 0,2 mg/ml, a partir de una solución madre de 2,5 mg/ml ⁽⁷²⁾. Las larvas control y las tratadas fueron incubadas en 1000µl de DiOC1 en placas de 24 pozos durante 1 minuto en la oscuridad. Transcurrido este tiempo de coloración, las larvas fueron lavadas en solución de Tyrode y colocadas en un soporte de agarosa 2% (Sigma , Ha-9915) para ser observada bajo el Microscopio de Fluorescencia Olympus IX71 (Japon), a una longitud

de onda de excitación entre 490-500 nm. Se realizaron registros fotográficos de las muestras, los cuales fueron analizados a través del mismo programa de análisis de imagen.

III.e. Análisis estadístico.

Mediante análisis estadístico, se calculó la linealidad de los datos de las variables dependiente (efecto: muerte) e independiente (concentración del tóxico) para una especie y un tiempo de exposición a través del método Probit. El Probit es un método paramétrico que permite relacionar una variable independiente (concentración del tóxico) y una variable dependiente (respuesta=mortalidad). Para ello fueron definidos los siguientes parámetros

- a) La concentración en $\mu\text{g/ml}$ de cada uno de los antibióticos (gentamicina, netilmicina y amikacina) transformada en logaritmo decimal (eje X)
- b) La respuesta acumulada de los organismos (mortalidad acumulada) se transforma a unidades probit (eje Y)

Una vez graficada la linealidad de los datos de las variables involucradas se calcula la correlatividad de los datos o coeficiente de determinación a través de la fórmula $y=a+bx$. El coeficiente de determinación es una medida estadística de la bondad del ajuste o fiabilidad del modelo estimado a los datos. Se representa por R^2 e indica cuál es la proporción de la variación total en la variable dependiente (Y), es decir, mide la capacidad explicativa del modelo estimado.

Una vez calculada el coeficiente de correlatividad se halla la Concentración letal 50 a través del análisis de Sperman-Kärber para el cálculo de las diferencias significativas con un 95% de confianza.

IV. RESULTADOS

IV.a. Dosificación de los aminoglicósidos (AGs).

IV.a.1. Concentración Letal Media (CL₅₀).

La magnitud de los efectos de los AGs sobre la población larvaria de pez cebra *Danio rerio*, quedó expresada a través de una relación concentración - respuesta, construida con el porcentaje de mortalidad en función de las diferentes concentraciones de los distintos productos ensayados; gentamicina, netilmicina y amikacina, y representada por una curva (Fig. 8a, 8b, 8c). Cabe destacar que el porcentaje de muerte de las larvas incrementó de manera dependiente de las concentraciones y del tiempo de exposición. Observándose para gentamicina y la amikacina (figs. 8a y 8c respectivamente), el 100% de mortalidad a las 72 horas a 60 µg/ml. En el caso de netilmicina (fig. 8b) el 100% de muerte se presentó en todas las concentraciones cuando el periodo de exposición fue a las 72 horas.

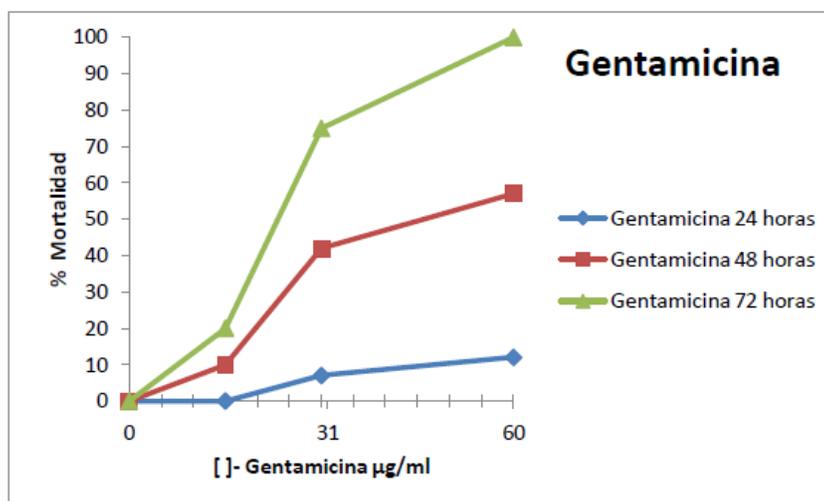


Fig. 8a. Curva concentración-respuesta para la gentamicina a las 24, 48 y 72 horas de exposición. Los resultados son expresados como % de mortalidad vs la concentración de la gentamicina. Cada punto corresponde al valor promedio de 3 experimentos realizados por triplicado con un N=30 larvas por punto ± con 0,5% de error estándar, estimado por el programa Excel 2013.

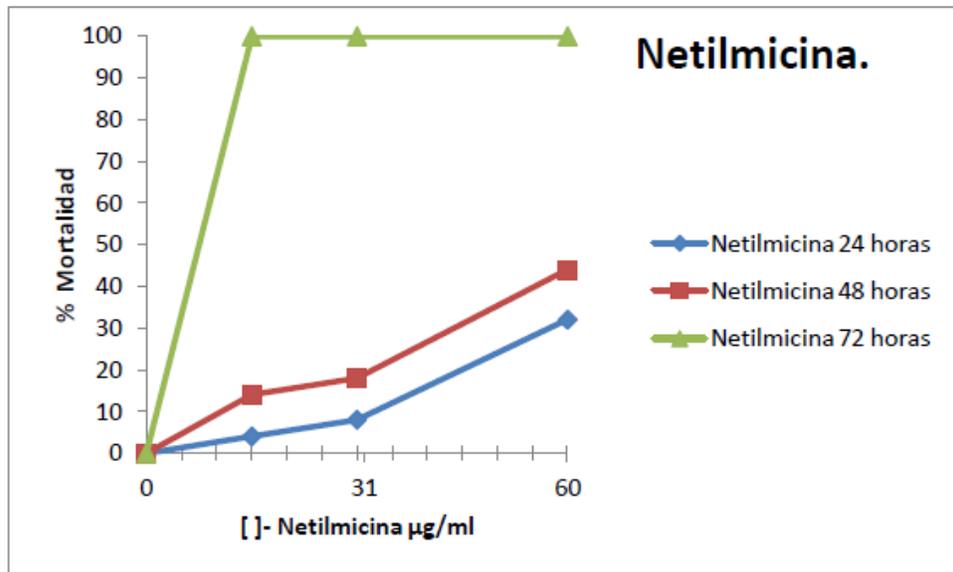


Fig. 8b. Curva concentración-respuesta para la netilmicina a las 24, 48 y 72 horas de exposición. Los resultados son expresados como % de mortalidad vs la concentración de la netilmicina. Cada punto corresponde al valor promedio de 3 experimentos realizados por triplicado con un N=30 larvas por punto \pm con 0,5% de error estándar, estimado por el programa Excel 2013.

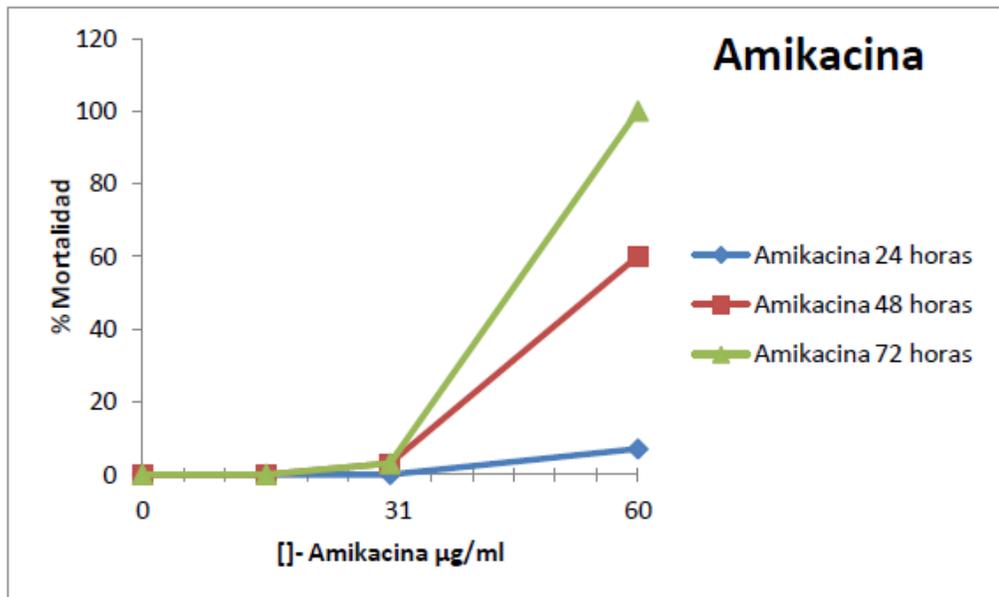


Fig. 8c. Curva concentración-respuesta para la amikacina a las 24, 48 y 72 horas de exposición. Los resultados son expresados como % de mortalidad vs la concentración de la amikacina. Cada punto corresponde al valor promedio de 3 experimentos realizados por triplicado con un N=30 larvas por punto \pm con 0,5% de error estándar, estimado por el Programa Excel 2013.

Al relacionar el logaritmo de las concentraciones con los porcentajes de respuesta de mortalidad, expresadas en términos de probabilidades del evento o unidades Probit, que es una medida estadística que relaciona la variable dependiente (efecto=muerte) con la variable independiente (concentración), lo cual se corresponde con la proporción de mortalidad expresada en unidades de desviación estándar de la media de una curva normal, se obtuvo una línea recta con un coeficiente de correlación que expresó una buena medida de asociación lineal entre las dos variables (concentraciones vs mortalidad), con un valor R^2 muy cercano a 1, que es la variación total de la variable independiente (Fig. 8a',8b',8c'). De las gráficas obtenidas se destaca una vinculación directa significativa entre ambas variables, a las 48 horas de exposición para los tres antibióticos

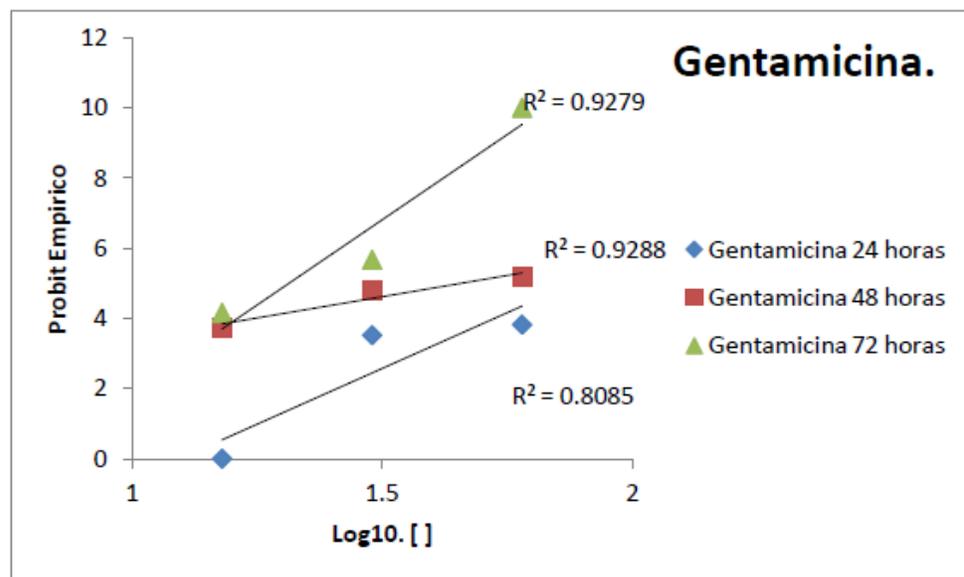


Fig. 8a'. Relación entre el logaritmo decimal de la concentración en $\mu\text{g/ml}$ de Gentamicina y el porcentaje de mortalidad en transformación Probit. Se destacan los coeficientes de correlación R^2 .

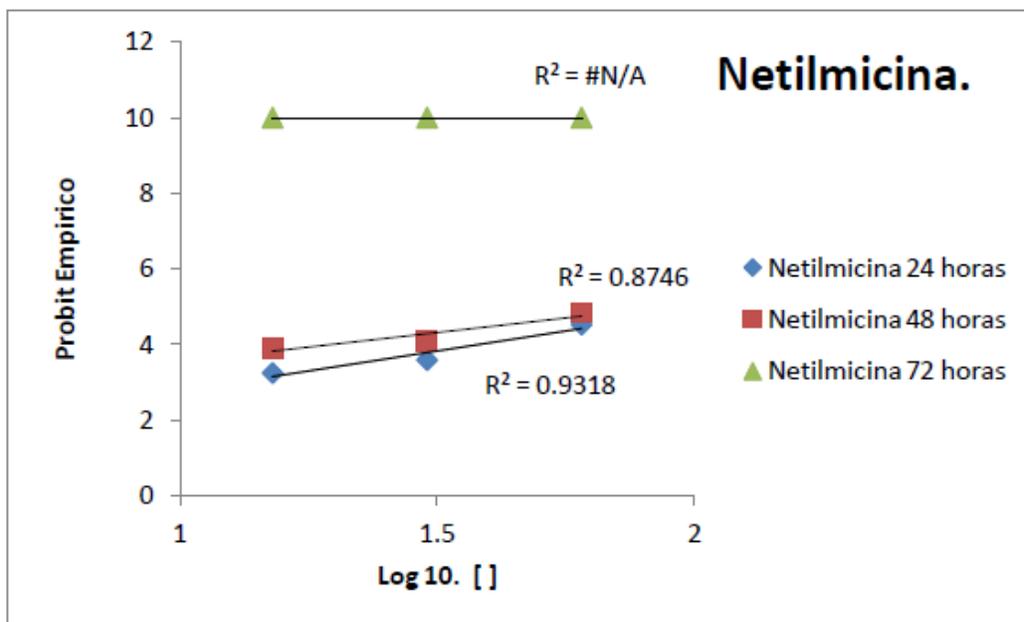


Fig. 8b'. Relación entre el logaritmo decimal de la concentración en $\mu\text{g/ml}$ de Netilmicina y el porcentaje de mortalidad en transformación Probit. Se destacan los coeficientes de correlación R^2 .

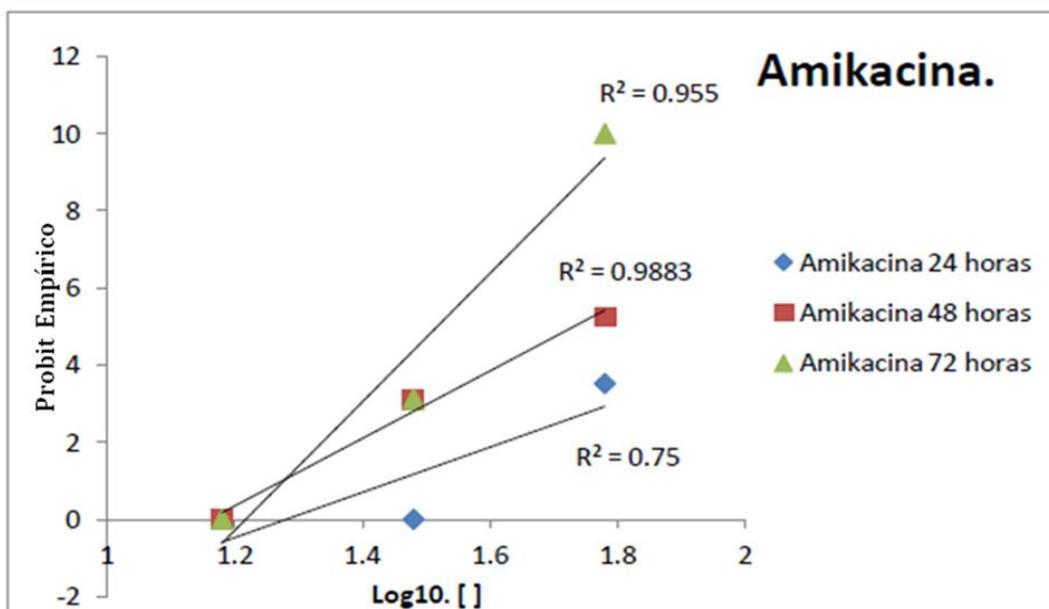


Fig.8c'. Relación entre el logaritmo decimal de la concentración en $\mu\text{g/ml}$ de Amikacina y el porcentaje de mortalidad en transformación Probit. Se destacan los coeficientes de correlación R^2 .

Una vez conocida la correlación positiva entre el porcentaje de mortalidad y la concentración de cada uno de los aminoglicósidos ensayados, se procedió a calcular la concentración letal media (CL_{50}) a las 48 horas de exposición, resultando para gentamicina 41,03 $\mu\text{g/ml}$; para netilmicina 41,49 $\mu\text{g/ml}$ y para amikacina 45,00 $\mu\text{g/ml}$. Al incorporarle a la desviación estándar (Sm) el valor de 95% de confianza, particularmente un factor de 1.645, se obtuvo la $CL_{50} \pm Sm$ para cada antibiótico. Dicha expresión permitió determinar el rango de concentraciones tóxicas caracterizadas por intervalo supra-letal correspondiente a $CL_{50} + Sm$ y un intervalo sub-letal correspondiente $CL_{50} - Sm$.

IV.a.2. Concentración Tóxica Media (CT_{50}).

A partir de la expresión $CL_{50} \pm Sm$ se pudo estimar los rangos de concentraciones tóxicas para cada antibiótico. Así, para gentamicina quedó definido entre **33.23 – 48.83 $\mu\text{g/ml}$** , para netilmicina entre **33.03 – 50.16 $\mu\text{g/ml}$** y amikacina entre **31.95 – 58.05 $\mu\text{g/ml}$** . De dichos intervalos se destaca que la concentración tóxica media para cada antibiótico fue aproximadamente similar; particularmente **33.23 y 33.03 $\mu\text{g/ml}$** para gentamicina y netilmicina respectivamente, y **31,95 $\mu\text{g/ml}$** para amikacina

IV.b. Efectos Tóxicos.

IV.b.1 Señales de acción tóxica de los AGs.

El análisis morfológico, demostró alteraciones morfológicas predominantes a las 48 horas de tratamiento, mientras que a las 24 horas de exposición las larvas mantenían características morfológicas similares a las larvas control y a las 72

horas predomino la muerte e incluso necrosis. Tanto gentamicina (Fig 9), netilmicina (Fig. 10) y amikacina (Fig. 11), promovieron la aparición de curvatura troncal, acompañado por una disminución en el desplazamiento, a las 48 horas. A las 24 horas las larvas permanecían con comportamiento y apariencia similar al control y a las 72 horas hubo 100% de muerte.

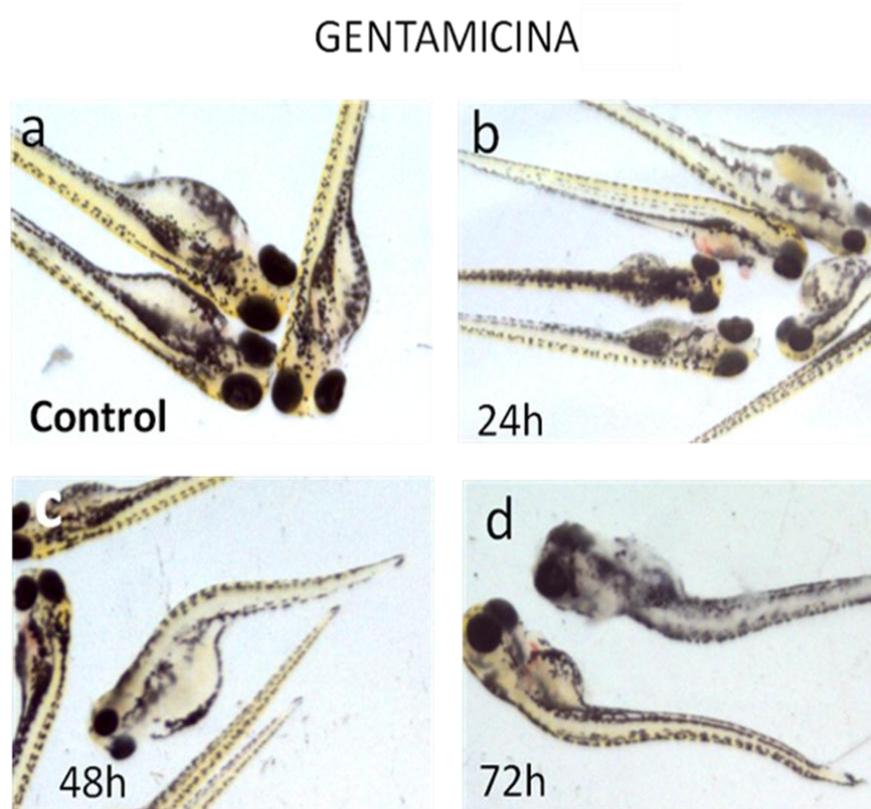


Fig.9 Morfología de larvas control y expuestas de gentamicina a las 24, 48, y 72 horas (b, c, d respectivamente). 24 horas larvas intactas, 48 horas de tratamiento efectos tóxicos predominantes como curvatura troncal 20% de la población 72 horas muerte.

NETILMICINA

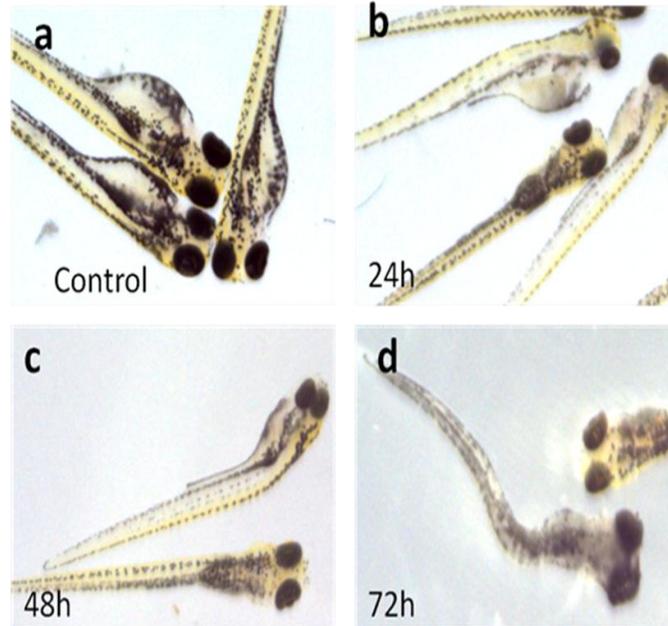


Fig. 10 Morfología de larvas control y expuestas a netilmicina a las 24, 48, y 72 horas (b, c, d respectivamente). 24 horas larvas intactas, 48 horas de tratamiento efectos tóxicos predominantes como curvatura troncal en 50% de la población 72 horas muerte

AMIKACINA

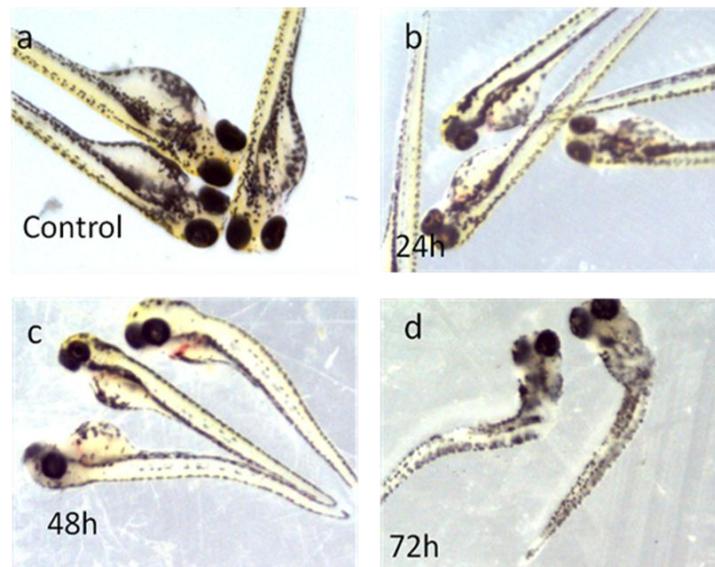


Fig. 11 Morfología de larvas control y expuestas a la amikacina a las 24, 48, y 72 horas (b, c, d respectivamente). 24 horas larvas intactas, 48 horas de tratamiento efectos tóxicos predominantes como curvatura troncal en el 15% de la población 72 horas muerte

Acompañando el efecto morfológico predominante, como fue la torsión troncal, se pudo determinar diferencias en los núcleos de osificación craneal, luego del análisis de las poblaciones larvares de 48 horas de tratamiento con los distintos antibióticos, incubadas con el Rojo de Alizarina (RA). Diferencias en la intensidad fluorescente del RA, permitieron identificar dichas diferencias. Así, se pudo observar tanto para gentamicina (Fig. 12), netilmicina (Fig. 13) y amikacina (Fig. 14) una reducción significativa del marcaje sobre los núcleos de osificación craneal respecto a los controles. Dichas diferencias control (Figs. 12a"; 13a"; 14a") y tratadas (Figs. 12b"; 13b"; 14b") fueron expresadas de manera semi-cuantitativamente a través de histogramas de densidad.

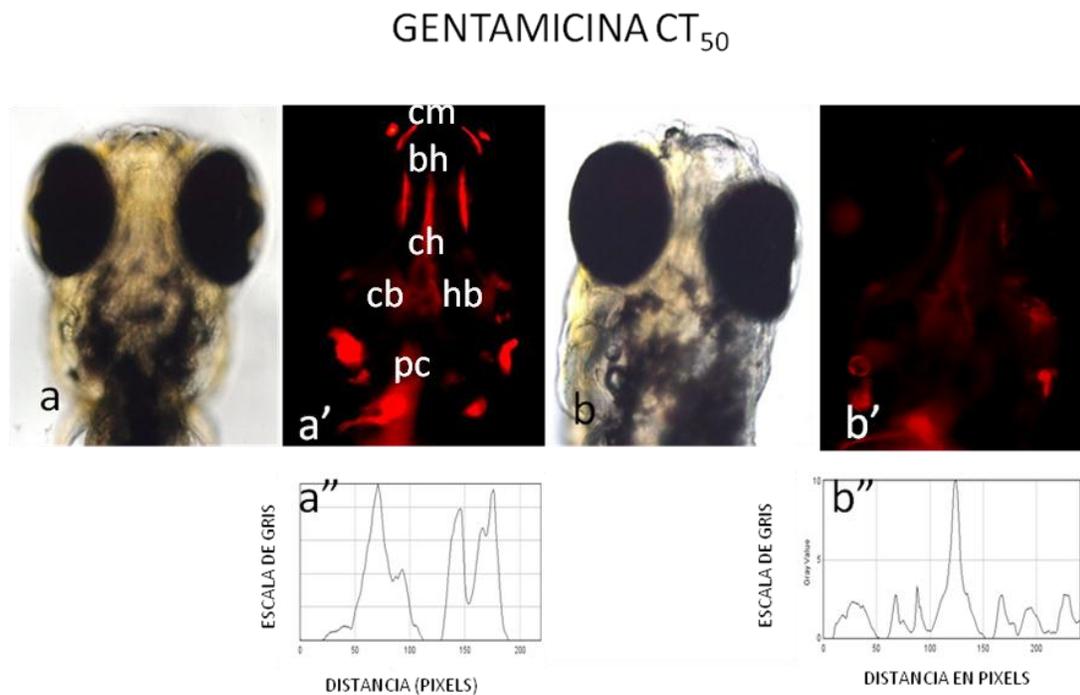


Fig. 12. Fotomicrografía de la anatomía cráneo-facial larva de 5dpf, control y tratada con gentamicina. Núcleos de osificación e histograma control (a', a'') y tratadas con CT₅₀ de gentamicina (b', b'') durante 48 horas de exposición.

NETILMICINA CT₅₀

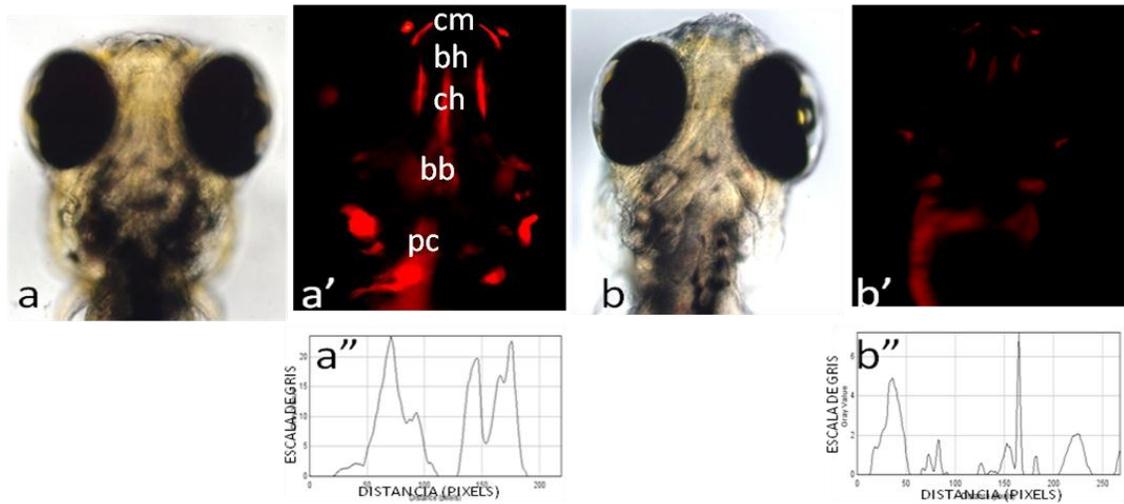


Fig. 13. Fotomicrografía de la anatomía cráneo-facial larva de 5dpf, control y tratada con netilmicina. Núcleos de osificación e histograma control (a', a'') y tratadas con CT₅₀ de netilmicina (b', b'') durante 48 horas de exposición.

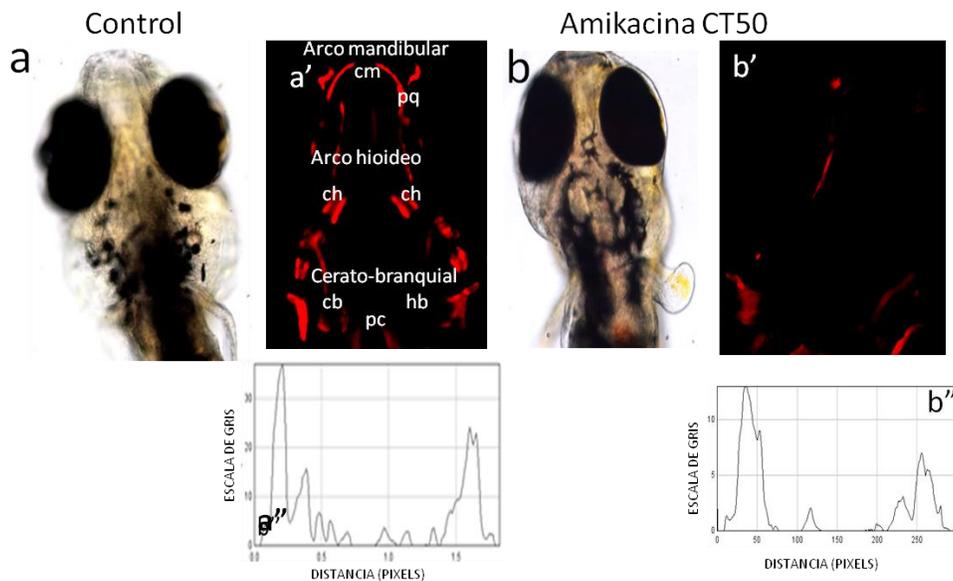


Fig. 14. Fotomicrografía de la anatomía cráneo-facial larva de 5dpf, control y tratada con amikacina. Núcleos de osificación e histograma control (a', a'') y tratadas con CT₅₀ de amikacina (b', b'') durante 48 horas de exposición.

IV.b.2 Análisis histoquímicos:

Desde el punto de vista histológico, cortes transversales de la porción craneofacial, permitieron describir cambios estructurales vinculados con desarreglo en la arquitectura tisular de esta región. Así cabe destacar en larvas tratadas con amikacina durante 48 horas, a diferencia del control (Fig. 15a), las muestras tratadas (Fig. 15b), presentaron una arquitectura tisular caracterizada por un tejido vacuolado, la tinción con azul de Toluidina así lo demuestra. Particularmente a nivel del cartílago hialino, los núcleos de osificación, presentaron, respecto a los controles (Fig. 15c), desarreglo de la arquitectura de los condroblastos (Fig. 15d), caracterizado por células redondeadas, con núcleos fragmentados y vaciamiento de la matriz extracelular de mineralización. Dicho vaciamiento se tradujo en una pérdida de la arquitectura del tejido cartilaginoso, puesta en evidencia a través de una tinción no uniforme y diferencial del Azul de Alcian (fig. 15e). Dichos cambios fueron también observados tanto para gentamicina como para netilmicina.

Un proceso de muerte celular por apoptosis fue puesto en evidencia con la reacción de TUNEL. (Fig. 16). Así, se pudo observar las diferencias significativas en cuanto al arreglo tisular, en cortes longitudinales controles (Fig. 16a) y tratados con amikacina por 48 horas (Fig. 16b). A mayor aumento, se pudo observar núcleos redondeados densos en el control (Fig. 16a') y núcleos fragmentados en los tratados con amikacina (16b').

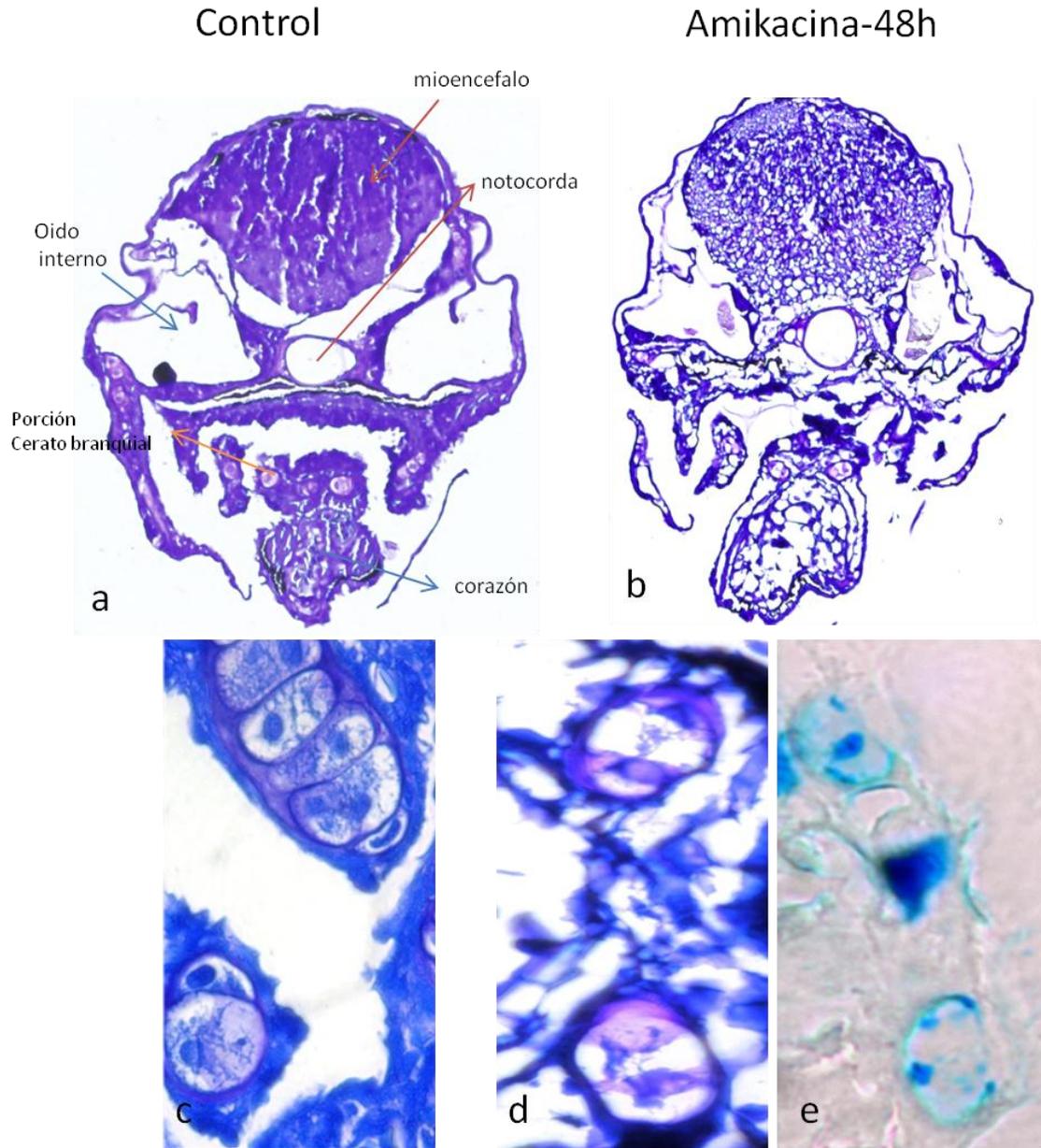


Fig.15. Cortes transversales de larvas control (a) y tratadas con Amikacina por 48 horas (b). se muestran los condroblastos de la porción cráneo-facial de larvas controles (c) y tratadas tenidas con azul de toluidina y alcian (d,e) respectivamente.

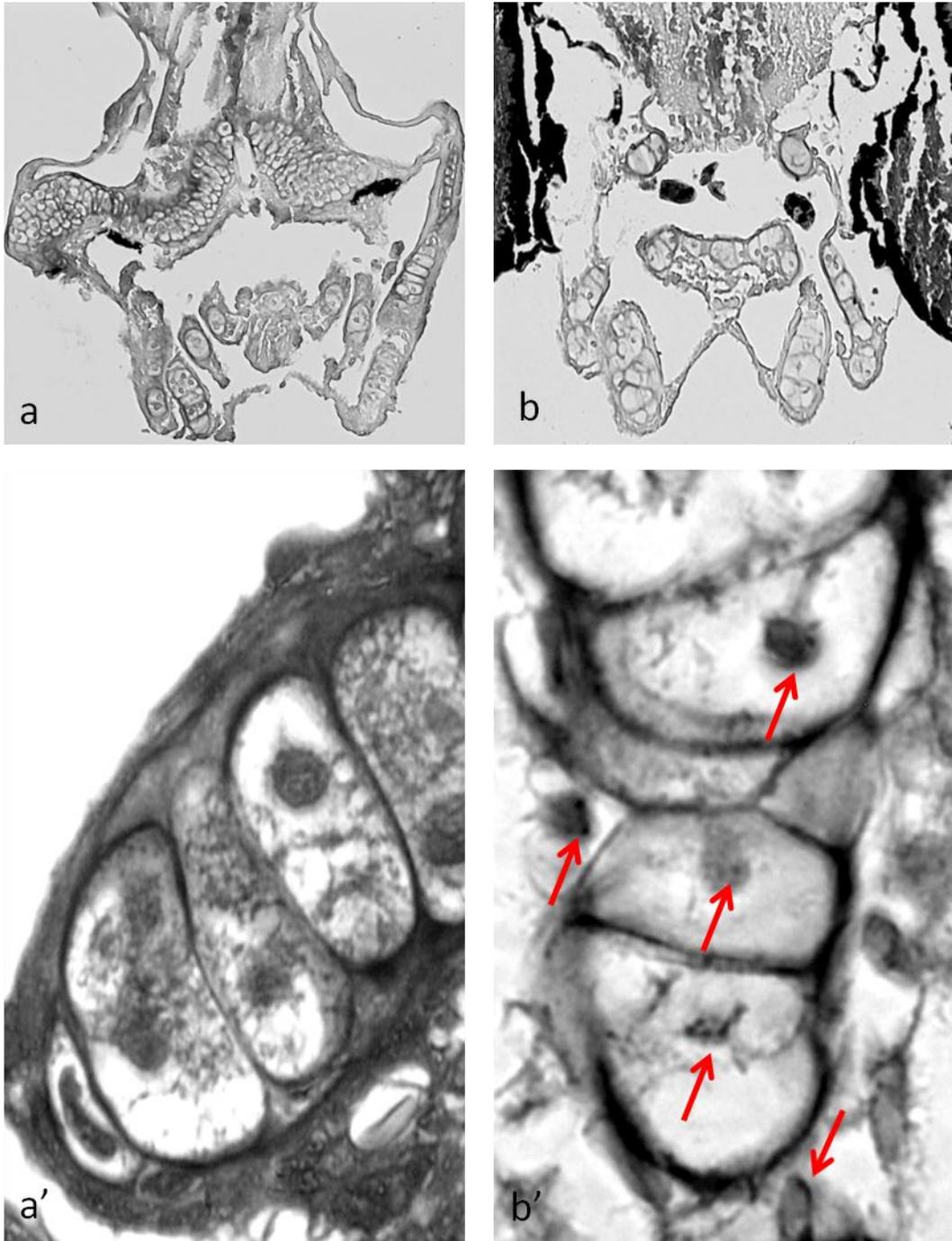


Figura 16: Corte histológico de larvas control (a) y tratadas con amikacina CT₅₀ (b). detección de apoptosis mediante la reacción de TUNEL. Las flechas señalan fragmentación nuclear.

IV.b.3 Actividad Enzimática

Las alteraciones observadas a nivel anatómico, con el análisis morfológico, histoquímico e inmunohistoquímico, estuvieron acompañadas por cambios a nivel de la bioquímica general de las larvas tratadas en comparación con la población larvaria control. En un homogenizado de población larvaria tratada con amikacina, a distintas concentraciones, se pudo observar valores distintos de la fosfatasa alcalina total en comparación al valor control de la misma (Fig. 17a), así como también un incremento en la concentración de iones fosfatos e iones calcio (Fig. 17b).

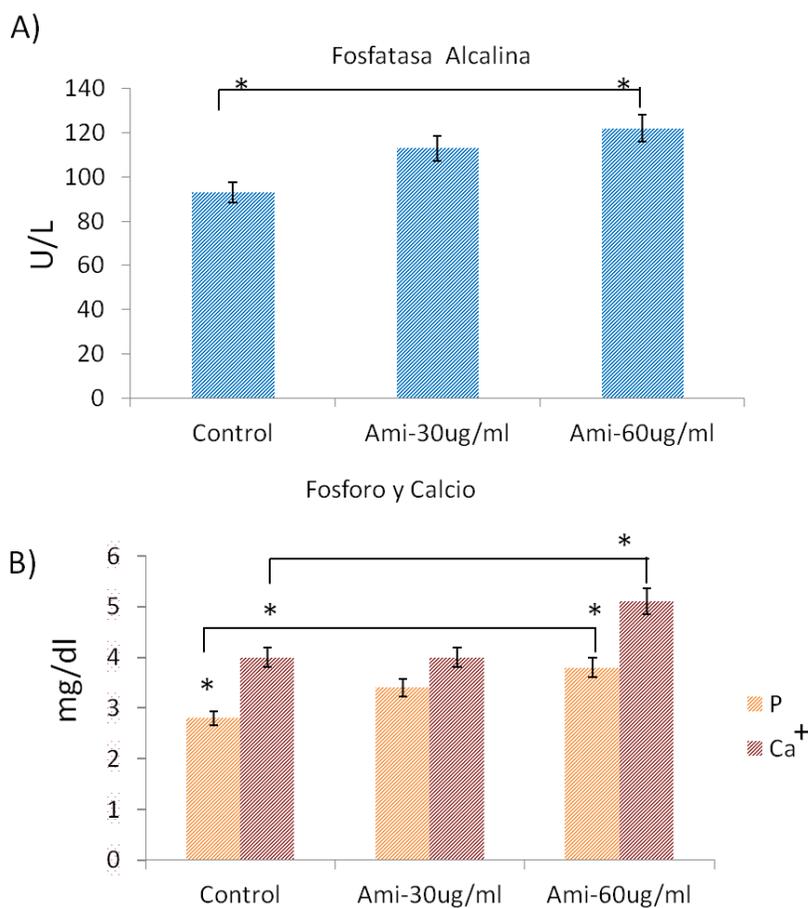


Fig. 17a. Actividad de la fosfatasa alcalina (U/L) en el macerado de larvas de pez cebra *Danio rerio*. **17b.** Concentración de fósforo inorgánico y calcio iónico (mg/dl) en macerado de larvas de pez cebra *Danio rerio* controles y tratadas con amikacina por 48 horas. *Estadísticamente significativo (ANOVA).

IV.b.4 Alteración en el patrón de la conducta de nado

La alteración en el patrón de la conducta de nado de larvas de pez cebra *Danio rerio* expuestas a la CT_{50} de los AGs, fue considerado como señal de respuesta tóxica sub-letal. La misma, fue puesta en evidencia a través del análisis de video-registros de la actividad de larvas controles en comparación con larvas tratadas. Así el trazado correspondiente a la trayectoria del desplazamiento de larvas control y tratadas se evidencia a través del marcaje con círculos rojos (Fig. 18 a, b). Una vez realizado el análisis de video se evidencia en el desplazamiento de larvas control una media de recorrido del área de $1,98\text{mm}^2$ (Fig. 18 a') mientras que para las tratadas fue de $1,12\text{mm}^2$ (Fig. 18b'), dando como resultado una velocidad media de desplazamiento calculada para control de $3,9\text{mm}^2/\text{seg.}$ y tratadas de $2,2\text{mm}^2/\text{seg.}$ Dicha diferencia se tradujo en un 57% menos de velocidad de desplazamiento en las larvas tratadas con Amikacina en comparación con los controles, resultados similares se obtuvieron para netilmicina y gentamicina.

Además de los cambios antes descritos, se registraron alteraciones en los neuromastomas de la población tratada con aminoglicósidos (Fig.19). Así, se pudo registrar, con el uso de sondas fluorescentes DiOC_1 , un marcaje diferencial en dichas estructuras, caracterizado por una intensa fluorescencia verde en los controles y reducción de la misma en los animales tratados. Dicha diferencia indica una pérdida de organización de las células que conforman los neuromastomas, puesta en evidencia a través de desarreglo en la estructuras de rosetas que la conforman.

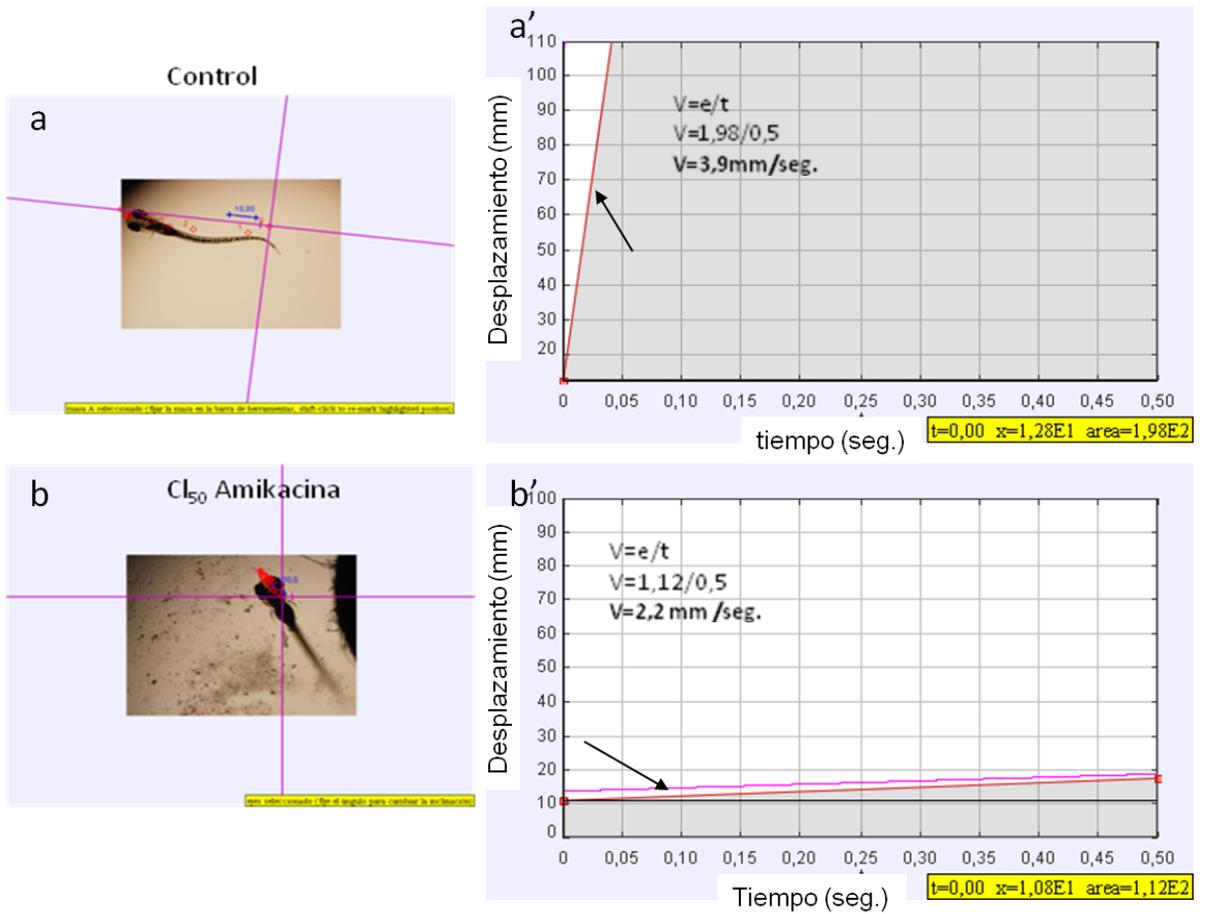


Fig. 18. Registro del análisis de video en donde se destaca la diferencia entre el área de desplazamiento de la larva control y tratada con CT50 de Amikacina por 48 horas. Particularmente la relación espacio/tiempo equivalente a la velocidad, resultó en una reducción de un 57%.

Programa Tracker

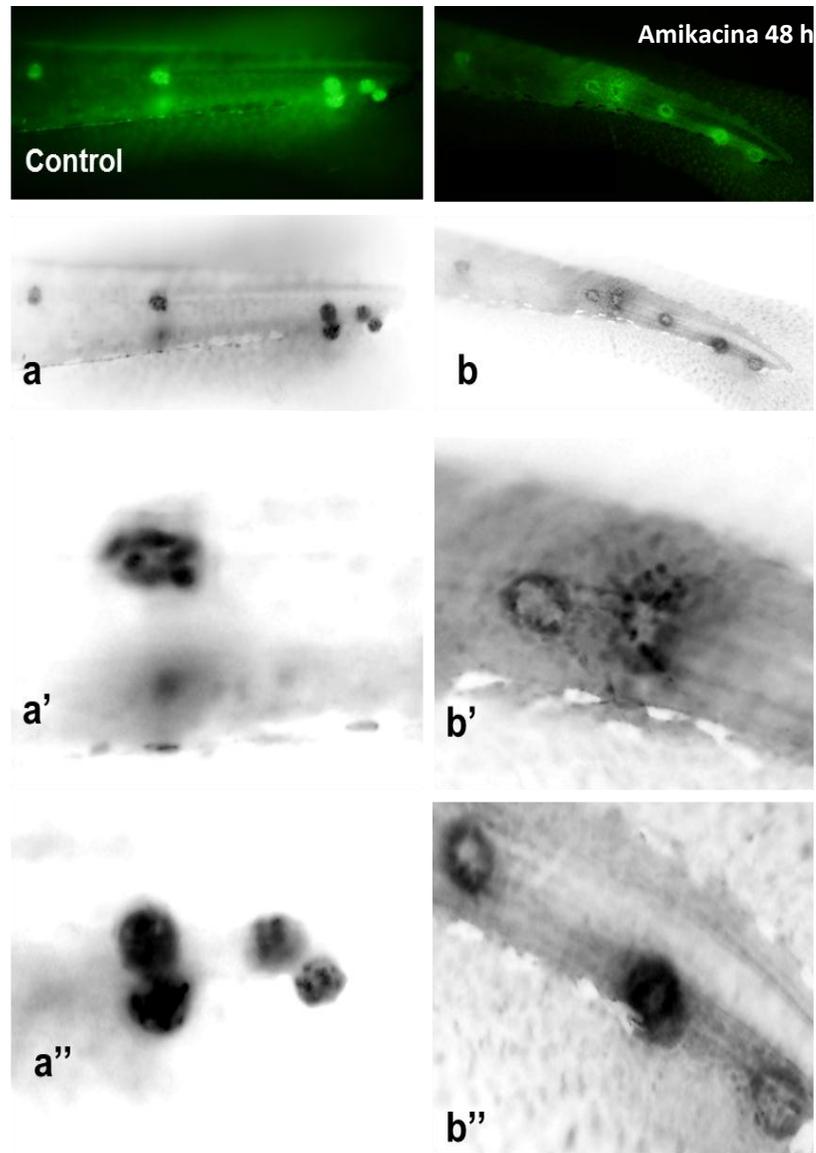


Fig. 19. Neuromastomas de la porción caudal de larva de pez cebra control y tratada con amikacina 48 horas. Tinción DiOC1. Inversión de las imágenes con el programa imageJ, para observar la morfología de los neuromastomas con aumentos crecientes en larvas controles (a, a', a'') y larvas tratadas con amikacina por 48 (b, b', b'')

V. DISCUSION

Los resultados obtenidos en la presente investigación permitieron demostrar la acción osteotóxica inducida por AGs, en el modelo experimental larvario de pez cebra *Danio rerio*. Una acción caracterizada como un proceso dependiente de la concentración y el tiempo de exposición a los AGs, evidenciándose a través de la alteración de los núcleos de osificación, con desarreglo de la arquitectura de las células que lo conforman, conducente a una disrupción cráneo-facial de la larva, con pérdida de cartílago y muerte celular por apoptosis

V.a. Toxicidad de los AGs.

La relación concentración-respuesta, analizada a través del estudio de la correlación entre la mortalidad de los individuos expuestos y las diferentes concentraciones ensayadas, permitió predecir una toxicidad diferencial asociada a cada uno de los aminoglicósidos estudiados, como un efecto dependiente de la concentración y el tiempo de exposición. En cuanto a la dependencia con la concentración, el análisis de dicha relación, permitió definir una toxicidad letal, es decir, a mayor concentración mayor efecto, destacándose la muerte larvaria como efecto letal agudo. En cuanto a la toxicidad diferencial dependiente del tiempo de exposición a estos aminoglicósidos que tienen como factor común el grupo 4,6 2-deoxiestreptamina, con una relación 2:1 azúcar/ciclitol, cabe destacar que el efecto sub-letal predominante, encontró su óptima expresión probabilística a las 48 horas, en concordancia con el factor R^2 de la relación lineal, a diferencia de las 24 y 72 horas en donde el efecto predominante quedó subestimado a las 24 horas y a las 72 horas de exposición.

Esta interpretación de los resultados concuerda con la realizada por otros autores, quienes han reportado por ejemplo, que el uso *in vitro* de Gentamicina en altas concentraciones, disminuye la actividad de los osteoblastos. También la aplicación de tobramicina en la línea celular de osteosarcoma humano en altas concentraciones induce una disminución significativa en la población de osteoblastos, como efecto dependiente de la concentración ^(44,45).

V.b. Ósteo-toxicidad.

La osteotoxicidad reportada en la presente investigación podría ser entendida como una disfunción en la arquitectura de los núcleos de osificación. Particularmente sobre centros de osificación de la porción cráneo-facial del sistema óseo de larvas de pez cebra, donde se evidencia la pérdida del patrón de mineralización, acompañada por una condensación nuclear de los osteoblastos, pérdida de matriz extracelular, reducción del cartílago y muerte celular por apoptosis. Al respecto cabe destacar, que la pérdida de mineralización ósea, ha sido también reportada en el modelo larvario de pez cebra *Danio rerio*, como una respuesta típica de acción osteotóxica inducida por otro tipo de medicamento como los glucocorticoides ^(73,74,75). También, esta pérdida de mineralización, ha sido reportada en investigaciones dirigidas a evaluar teratogénesis de cartílago y formación de hueso en embriones de pez cebra *Danio rerio*, expuestos durante largo periodo de tiempo a plaguicidas ⁽⁷⁶⁾. Esta teratogénesis inducida por plaguicidas como Disulfiran e Hidrazida ha sido caracterizada por malformaciones de estructuras cartilaginosas del neurocranium, del Cartílago de Meckel y fracturas a nivel de

notocorda. La deformación cefálica reportada en la presente investigación coincide con dichos resultados.

Hasta el presente, poco se conoce sobre los mecanismos vinculados con dicho proceso de osteotoxicidad y mucho menos del proceso de desmineralización inducida por AGs. Sin embargo, la apoptosis, bien sea generada a través de una elevada producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), o generada a través de un desequilibrio en la homeóstasis del calcio (Ca^{+2}), ha sido sugerida por otros autores, como una posible característica de la acción tóxica de estos compuestos ⁽⁷⁷⁾. Pudiendo deberse el aumento tanto de los iones calcio y fósforo así como de la enzima fosfatasa alcalina reportada en nuestros resultados, a la liberación de estos iones y enzima de la matriz extracelular en el momento de la ruptura de los tejidos y órganos en el macerado larvario; así como también podría deberse a algún mecanismo compensatorio por el daño óseo inducido que podría haberse activado debido a la exposición de los aminoglicósidos y por tanto la disminución de la mineralización ósea observada a través del rojo de alizarina.

En tal sentido, ha sido reportado que la acción tóxica de otros antibióticos distintos a los estudiados, pero también de amplio uso farmacéutico tales como las tetraciclinas, se expresa a través de un proceso de apoptosis estudiado en modelo experimental de pez cebra *Danio rerio*. Así, la toxicidad de la tetraciclina en el modelo embrionario de pez cebra *Danio rerio*, expuesto a distintas concentraciones, induce una

serie de disrupciones del fenotipo de los embriones que incluye, retardo en el proceso de eclosión, acortamiento de la longitud del cuerpo, incremento del saco vitelino y una vesícula natatoria poco definida. Todos estos efectos tóxicos sub-letales, han sido vinculados con daño oxidativo, a través de un incremento significativo de especies reactivas de oxígeno (ROS) y un proceso de muerte celular por apoptosis. La naranja de acridina y la polimerasa en tiempo real así lo demostró ⁽⁷⁸⁾. Otros antibióticos, tales como la norfloxacin, también demostró ser un factor de impacto en la producción de ROS, así como tener un papel inductor en el desequilibrio en la homeóstasis del calcio, sugiriendo a ambos eventos como posibles responsables de la acción tóxica de estos compuestos, estudiados en células auditivas del modelo adulto y larvario de pez cebra *Danio rerio* (77,78)

Sí dichas características del mecanismo de acción tóxica de los AGs alcanzan el sistema óseo y particularmente se vinculan con la acción osteotóxica demostrada por los AGs empleados en la presente investigación: gentamicina, netilmicina y amikacina, no ha sido posible establecerlo de manera contundente, sin embargo, la demostración de la apoptosis así como los altos niveles calcio y otros iones como el fósforo y modificación de la fosfatasa alcalina reportados en estos resultados sugieren que dichos compuestos tengan incluidos en su mecanismos de acción procesos conectados con la producción de ROS, así como alteraciones en la homeostasis del calcio total y otros iones como característica de osteotoxicidad de los mismos.

Por otra parte este trabajo permitió también detectar otras alteraciones como disminución de la velocidad de nado y cambios en la arquitectura de los neuromastomas, lo cual podría permitir establecer una posible relación entre disminución de la velocidad de nado, curvatura troncal y alteración de la estructura de los neuromastomas. Como es sabido, las estructuras anatómicas sensoriales como son los neuromastomas, han sido definidas como la base de la regulación y control de la actividad motora y el comportamiento del individuo. Especialmente en el modelo larvario de pez cebra *Danio rerio*, ha sido identificado como un circuito locomotor espinal ^(79,80). Caracterizado por una parte, a través de la relación anatómica de los neuromastomas con las vías regulatorias nerviosas centrales y por otra parte con estructuras específicas de proteínas del citoesqueleto, requeridas para el adecuado movimiento larvario ⁽⁸¹⁾. Este circuito media la actividad motora, la velocidad natatoria y la respuesta a otros estímulos ambientales ⁽⁸²⁾. Una intervención de estas relaciones anatómicas podría comprometer la funcionalidad de las mismas. Por tanto, la modificación estructural de los neuromastomas, reportado en la presente investigación, que pudiera estar vinculada con las conocidas propiedades hidrofílicas de los aminoglicósidos, estaría promoviendo la adhesión y desarreglo del conjunto de células ciliadas que constituyen esta estructura sensorial. Dicho desarreglo traería como consecuencia, por una parte el bloqueo mecánico de los movimientos que estimulan la liberación en los terminales nerviosos ⁽⁸³⁾, disminuyendo así la capacidad de respuesta a los estímulos ambientales y por otra parte alterando la homeostasis de proteínas estructurales del citoesqueleto tales como la actina y tubulina, con lo cual se vería afectado la capacidad de desplazamiento y la postura corporal. Esto podría ayudar a entender la reducción de la velocidad de desplazamiento y la curvatura troncal respectivamente. Interpretaciones similares han sido reportadas por

otros autores ^(84,85,86) quienes haciendo uso de sustancias altamente hidrofílicas como la acrilamida y otros compuestos químicos, han reportado reducción en la velocidad de desplazamiento, como una alteración de la actividad motora en el modelo larvario de pez cebra, tanto en adultos como larvas. Dichas alteraciones han sido asociadas con un daño directo sobre la estructura anatómica del tejido cerebral y proteínas específicas como la tubulina y actina ^(84,85,86)

De lo anteriormente expuesto resulta evidente que los efectos tóxicos sub-letales reportados en la presente investigación, particularmente la pérdida del patrón de nado y la curvatura troncal de la población larvaria tratada con AG, se traduciría en la alteración del patrón topográfico de la estructura de las células que constituyen sistemas sensoriales como los neuromastomas, promovido probablemente, por la hidrofiliidad de estas sustancias medicamentosas, como se puso en evidencia en los resultados.

En todo lo anteriormente expuesto, radica la importancia del estudio de sustancias químicas con importancia terapéutica clínica y relevancia toxicológica, ya que como se observó en el caso de los antibióticos aminoglicósidos, ha lanzado una alerta con respecto a la ósteo-toxicidad, importante efecto que obliga al estudio más exhaustivo de sus efectos secundarios a nivel del sistema óseo.

VI. CONCLUSIONES

- La gentamicina, netilmicina y amikacina, inducen toxicidad diferencial dependiente de la concentración y el tiempo de exposición en modelo larvario de pez cebra *Danio rerio*
- Los AGs, gentamicina, netilmicina y amikacina, inducen pérdida del patrón de mineralización craneoencefálica, en el modelo larvario de pez cebra *Danio rerio*.
- Los AGs, gentamicina, netilmicina y amikacina alteran la arquitectura de los Núcleos de osificación, caracterizado por condensación nuclear de los osteoblastos, pérdida de matriz extracelular, reducción del cartílago y muerte celular por apoptosis, en larvas de pez cebra *Danio rerio*.
- Los AGs, gentamicina, netilmicina y amikacina inducen la elevación de iones importantes en la regulación de la excitabilidad de fibras musculares como el calcio y fosforo en modelo larvario de pez cebra *Danio rerio*.
- Los AGs, gentamicina, netilmicina y amikacina inducen alteración de enzimas relacionadas con la actividad osteoblástica como la fosfatasa alcalina.
- Los AGs, gentamicina, netilmicina y amikacina inducen señales de daño en los sistemas sensoriales, evidenciado a través de alteración de la actividad motora, modificación del eje postural y alteración estructural anatómica de los neuromastomas.

VII. RECOMENDACIONES.

1. Ampliar el estudio con estos antibióticos en el modelo larvario de pez cebra tanto embriones, larvas y adultos.
2. Evaluar la expresión de compuestos como osteocalcina, un marcador específico de mineralización de tejidos
3. Evaluar alteración en la expresión de la proteína *BMP*, *Sox 9* y *BACL* lo cual pudiera ampliar el entendimiento y precisar el mecanismo molecular y genético que explique este fenómeno de osteotoxicidad inducida por estos compuestos.

VIII. BIBLIOGRAFIA.

1. Apschner A. Putting crystals in place- the regulation of biomineralization in zebrafish. UMC Repository. 2014
2. Negri AL. Regulation of bone by inorganic and peptide factors. Rev. Argent Endocrinol Metab. 2011; 48: 216-224.
3. Portal Wordpress [<http://pezcebradesarrollo.wordpress.com/>], Uruguay: Desarrollo del Pez Cebra Sitio para maestros sobre el desarrollo del Pez Cebra y su enseñanza en la escuela. [Actualizada en Marzo 2014; Acceso 20 Septiembre 2013].
4. Schilling TF, Kimmel CB. Segment and cell type lineage restrictions during pharyngeal arch development in the zebrafish embryo. Develop 1994; 120: 483-494.
5. Álvarez M. Blancos de acción toxica de antibióticos en el modelo experimental larvario de pez cebr *Danio rerio*. XVII Jornadas de Ciencias Morfológicas del Instituto Anatómico “José Izquierdo”. Caracas 23 de Octubre 2006. Universidad Central de Venezuela.
6. Barranco E. Aminoglucósidos. Acta Médica 1998; 8(1): 48-53.
7. Palomino J, Pachón J. Aminoglucósidos. Enferm Infecc Clin 2003; 21(2): 105-15.
8. Witson E, Persen L, Benum P, Aamondt A, Husby OS, Berghk. High Local concentrations without systemic adverse effects after impaction of netilmicin-impregnated bone. Acta Orthop Scand 2004; 75 (3):339-346
9. Mari-Beffa M., Murciano C. dermoskeleton Morphogenesis in Zebrafish find. Dev Dyn 2010; 239: 2779-2794. Doi.10.1002/dvdy.22444
10. Goldsmith JR y Jobin C. Think Small: Zebrafish as a Model System of Human Pathology. J Biomed Biotechnol 2012; 1: 1-12.
11. Antonetti C. Centros de Osificación de la Mano. Revista de la Sociedad Venezolana de Ciencias Morfológicas. 2012; 18: 21-25

12. Alvarez M., Perdomo L. Carbonated Water and Necro-apoptotic Cell Death in Chicken Embryo Low Limb. *Int.J.Morphol.*2009; (2):317-325.
13. Gartner LP, Hiatt JL. *Texto Atlas de Histología*. 3ed. USA: Editorial Mc Graw; 2007.
14. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*. 2002. 108 (1):17-29.
15. Becerra J, Andrade J, Santamaria J, Cifuentes M, Guerado E. Regeneracion osea, terapia celular e ingenieria tisular. *Med Clin (Barc)* 2001; 116:23-34
16. [Consultado Diciembre 2013] Disponible en: orbi.ulg.ac.be/bitstream/2268/.../1/thesis2013.docx
17. Le Pabic P., Ng C., Schilling TF. Fact-Dachsous Signaling Coordinates Cartilage Differentiation and Polarity Craniofacial Development. *Plos Genetics*.2014; 10 (10):1-14
18. Duque JF. Crestas Neurales, Placodas y Arcos Braquiales: Una Revisión Evolutiva y Embriológica de Datos Básicos y Recientes. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 2003; 27 (103): 291-307
19. Aliño Santiago M, López Esquirol J, Navarro Fernández R, Duperval Maletá P. Aminoglucósidos: mirada actual desde su historia. *Rev Cub Pediatr* 2007; 79(2): 1-10.
20. Reid IR. Glucocorticoid osteoporosis--mechanisms and management. *Eur J Endocrinol*. 1997; 137 (3): 209-17.
21. Gnant M. Management of bone loss induced by aromatase inhibitors. *Cancer Invest*. 2006; 24 (3): 328-30.
22. Instituto de Higiene. Universidad de la República. Facultad de Medicina. Cátedra de Bacteriología y virología. 2006 [FEFMUR]. Uruguay.
23. Mella S, Sepúlveda M, González G, Bello H, Domínguez M, Zemelman R, et al. Aminoglucósidos-aminociclitolos: Características estructurales y nuevos aspectos

- sobre su resistencia. Rev Chil Infect 2004; 21(4): 330-338.
24. Vakulenko SB, Mobashery S. versatility of aminoglucoSIDOS and prospects for their future. Clin Microbiol Rev. 2003;16:430-450
 25. Davis BD. Mechansm of bactericidal action of aminoglicosides. Clin Microbiol Rev. 1987;51:341-350
 26. Barza M, Scheife RT. Drug therapy review: Antimicrobial spectrum, pharmacology and therapeutic use of antibiotics part 4 aminoglycosides. Am J Hosp Pharm. 1977; 34: 723-737.
 27. Price KE, De Furia MD, Pursiano TA. Amikacin and aminoglycoside with marked Activity against Antibiotics resistance clinical isolates. J of Infect dis. 1976; 134: S249-S261
 28. Collins PW, Twine JM. The ototoxic effects of different doses of gentamicin on the cochlea of pigmented guinea pigs. Br J Audiol. 1985; 19(4): 257-64.
 29. Murillo-Cuesta S, Contreras J, Cediell R, Varela-Nieto I. Comparisson of different aminoglycoside antibiotic treatments to refine ototoxicity studies in adult mice. Lab Anim. 2010; 44 (2): 124-131.
 30. Stepanyan, RS, Indzhukulian A, Vélez-Ortega AC, Boger ET, Steyger PS, Friedman TB et al. TRPA1-mediated accumulation of aminoglycosides in mouse cochlear outer hair cells. JARO 2011 Dec; 12 (6): 729-740.
 31. Faucher K, Aas-Hansen O, Damsgard B, Laukli E, Stenklev N. Damage and functional recovery of the Atlantic cod (*Gadus morhua*) inner ear hair cell following local injection of gentamicin. Int J Audiol. 2009; 8 (3): 1-9.
 32. Smith CR, Maxwell RR, Edwards CQ, Rogers JF, Lietman PS. Nephrotoxicity induced by gentamicin and amikacin [Abstract]. Johns Hopkins Med J. 1978; 142(3): 85-90.
 33. Sairio E, Kasanen A, Kangas L, Nieminen AL, Nieminen L. The nephrotoxicity and renal accumulation of amikacin, tobramycin and gentamycin in rats, rabbits and guinea pigs [Abstract]. Exp Pathol. 1978; 15(6): 370-375.
 34. Mediavilla A. Antibiótico aminoglucoSIDOS y glucopéptidos. En: Florez J.

- Farmacología humana. España: Elsevier. 2009. 1107-1121.
35. Burkle W. Comparative evaluation of the Aminoglycoside Antibiotics for Systemic use. *Drug Intell Clin Pharm.* 1981; 15: 847-62.
 36. Tang RK, Tse RK. Acute renal failure after topical fortified gentamicin and vancomycin eyedrops. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2011 Aug; 27(4): 411-3.
 37. Johnsson LG, Hawkins JE, Kingsley TC, Black FO, Matz GJ. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1981; 383: 1-19.
 38. McNeil JS, Jackson B, Nelson L, Butkus DE: The role of prostaglandins in gentamicin-induced nephrotoxicity in the dog. *Nephron Exp Nephro* 1983; 33: 202-207.
 39. Rodríguez-Barbero A, Rodríguez-López AM, González-Sarmiento R, López-Novoa JM. Gentamicin activates rat mesangial cells. A role for platelet-activating factor. *Kidney Int.* 1995; 47: 1346-1353.
 40. Rodríguez-Barbero A, López-Novoa JM, Arévalo M. Involvement of platelet-activating factor in gentamicin nephrotoxicity in rats. *Exp Nephrol.* 1997; 5: 47-54.
 41. Fukada Y, Malmberg AS, Aperia A. Gentamicin inhibition of Na-K-ATPase in rat kidney cells. *Acta Physiol Scand* 1991; 141: 27-34.
 42. Morales A, Arévalo M, Pérez-Barriocanal F. Mecanismos implicados en la nefrotoxicidad producida por aminoglucósidos. *Nefrología* 2000; 20(5): 408-414.
 43. Halliwell B, Gutteridge JMC: Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 1984; 219: 1-14.
 44. Den Hertog J. Chemical Genetics: Drug Screens in Zebrafish. *Bioscience Reports* 2005; 25: 289-297.
 45. Miclau T, Edin ML, Lester GE, Lindsey RW, Dahners LE. Bone toxicity of locally applied aminoglucosidos. *J Orthop Trauma* 1995; 9(5):401-6
 46. Isefuku S, Joyner CJ, Simpson AH, Gentamicin may have and adverse effects on osteogenesis. *J Orthop Trauma.* 2003. 17 (3):212-6

47. Ince A., Schiitze N., Karl N., Löhr JF., Eulert J. Gentamicin negatively influenced osteogenic function in vitro. *Int Orthop*. 2007. 31 (2):223-8
48. Owens KN, Coffin AB, Hong LS, Bennett KO, Rubel EW, Raible DW. Response of mechanosensory hair cells of the zebrafish lateral line to aminoglicosidos reveals distinct cell death pathways. *J Speech Lang Hear Res*. 2009. 253 (1-2):32-41.
49. Brozman E, Wrzesniok D, Surazynski A, Patka J, Moleda K. Effect of melanin on netilmicin-induced inhibition of collagen biosynthesis in human skin fibroblast. *Bioorg Med Chem*.2006; 14 (24):8155-61
50. Pasqualetti S, Banfi G, Mariotti M. The zebrafish scale as model to study the bone mineralization process. *J Mol Hitol*. 2012; 43 (5):589-95.
51. Mari-Beffa M, Santamaria J, Murciano C, Santos-Ruiz L, Andrades J, Guerado E, Becerra J. Zebrafish fins asa model system for skeletal human studies. *J Scient World*. 2007; (7): 1114-1127
52. Eames BF, Amores A, Yan YL, Postlethwait JH. Evolution of the osteoblast: skeletogenesis in gar and zebrafish. *BMC Evol Biol* 2012; 12(27).
53. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 1995; 203 (3): 253-310
54. Marcellini S, Bruna C, Henriquez J, Albistur M, Reyes A, Barriga E et al. Evolution of the interaction between RUunx2 and VDR, two transcription factors involved in osteoblastogenesis. *BMC Evol Biol*. 2010, 10:78
55. Emran F, Brooks JM, Zimmerman SR, SL Johnson, Lue RA. Zebrafish embryology and cartilage staining protocols for high school students. *El pez cebra*. 2009; 6 (2):139-43. Doi: 10.1089/zeb.2008.0567
56. Antonetti C. Osificación de las alas esfenoides en fetos humanos venezolanos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Ciencias Morfológicas*. 2010; (16):21-25
57. Rojas-Muñoz A, Miana A, Izpisúa J. El pez cebra, versatilidad al servicio de la biomedicina. *Investig Cienc* 2007; 62-9.

58. Kerstin H, Matthew D. C, Torroja C, Torrance J, Berthelot C, Muffato M et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 2013; (496) 498-503. doi:10.1038/nature12111
59. Bhusnure OG, Mane JM, Gholve SB, Thonte SS, Giram PS, et al. Drug Target Screening and its Validation by Zebrafish as a Novel Tool. *Pharm Anal Acta* 2015; 6:426. doi:10.4172/2153-2435.1000426
60. Maldonado E. Experimentación en el pez-cebra, un modelo de biología del desarrollo. *Mensaje Bioquímico* 2003; XXVII: 147-156.
61. Lozada J, Palmeros BS, Ramírez MB, Fernández M. El pez cebra: una especie modelo. *Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana* [Artículo en línea] 2012. [Consultado 20 Oct 2012]. Disponible en: <http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol25num1/articulos/pez>
62. Silva N. Sistema Óseo en peces. Consultado en Octubre 23, 2012. Disponible en: http://docente.uco.mx/al028741/public_html
63. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 1995; 203 (3): 253-310
64. Osorio J, Martínez Yépez PN. Análisis del procedimiento para la determinación de la dl50. *Revista de investigaciones de la Universidad del Quindío*; 4 (12): 1-3. [Libro electrónico] [Consultado 10 Oct 2012]. Disponible en: <http://www.ilustrados.com/tema/3965/Analisis-procedimiento-para-determinacion-dl50-dosis.html>
65. Díaz Báez MC, Bulus Rossine GD, Pica Granados Y. Capítulo 5: Métodos Estadísticos para el Análisis de Resultados de Toxicidad [Libro electrónico] 2005. [Consultado 6 Sep 2012] Disponible en: http://web.idrc.ca/es/ev-84468-201-1-do_topic.html
66. García del Moral R. Laboratorio de anatomía patológica. 1ra ed. Madrid: Interamericana-McGraw-Hil; 1993.
67. Prophet E, Mills B, Arrington J, Sobin L. Manual de Técnicas Histológicas. Métodos Histotecnológicos del AFID. Registro de Patología de los EEUU (ARP). Washington, D.C; 1992.

68. Panizo Santos A. y Vega Vásquez F. Técnicas de inmunohistoquímica. Estudio de la apoptosis mediante la técnica de TUNEL. Rev Esp Patol 1997; 30 (3) 243-45.
69. Bowers GN, Pestaner LC, Gibberman V. A Continuous spectrophotometric method for measuring the activity of serum alk.phos. Clin Chem. 1966; 12:70-89
70. Burtis C, Ashwood E. Tietz textbook of Clinical Chemistry. WB Saunders Co. 3era edicion; 1999
71. Weissman N, Pileggi VJ. In Clinical Chemistry- Principles and Technics, 2da ed. RJ Henry et al., Eds. Harper & Row, Hagerstown, ,D 1974; 720-728
72. Douglas Brown, USA; 2012 [Actualizada 2012; acceso Septiembre 2012]. <http://www.cabrillo.edu/~dbrown/tracker/>.
73. Alderton W, Berghmans S. Zebrafish: a versatile in vivo model for drug safety assessment. 2006 [Consultado Diciembre 2012]. Disponible en: <http://www.ddwonline.com/chemistry.html>
74. Jing LJ, Wang CM, Wei YJ, Jia XB, Xie L. Screening antiosteoporotic active parts of dipsacus radibased on zebrafish model. Zhong Yao Cai. 2014; 37(4):635-40
75. Pasqualetti S, Congiu T, Banfi G, Mariotti M. Alendronate recued osteoporotic phenotype in a model of glucocorticoid induced osteoporosis in adult zebrafish scale. Int Exp Pathol. 2015; (1):11-20
76. Strecker R, Weigt S, Braunbeck T. Cartilage and bone malformations in the head of zebrafish (*Danio rerio*) embryos following exposure to disulfiram and acetic acid hydrazide. Toxicol Appl Pharmacol. 2013; 268(2):221-31.
77. Esterberg R, Hailey D, Coffin A., Raible D, Rubel E. Disruption of intracellular calcium regulation in integral to Aminoglycoside- induced hair cell death. J Neurosci. 2013; 33(17):7513-7525
78. Zhan Q, Cheng J, Xin Q. Effects of tetracycline on developmental toxicity and molecular responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Ecotoxicology 2015; 24 (4) 707-19
79. Bartoskova M, Dobsikova R, Stancova V, Pana O, Zivna D, Plhalova L, Blahova

- J, Marsalek P. Norfloxacin-Toxicity for Zebrafish (*Danio rerio*) Focused on Oxidative Stress Parameters. Biomed Res Int 2014; 2014: 1-6
80. Gabriel JP, Mahmood R, Walter AM, Kyriakatos A, Hauptmann G, Calabrese RL, El Manira . Locomotor pattern in the adult Zebrafish spinal cord in vitro. J Neurophysiol. 2008; 99(1):37-48.
81. Husain R, Dixit R, Das M y Seht PK. Neurotoxicity of acrylamide in developing rat brain: changes in the levels of brain biogenic amines and activities of monoamine oxidase and acetylcholine esterase. Ind Health Care 1987; 25:19-28.
82. Yu SF, Song FY, Yi C, Yang XW, Li GZ, Zhang CL y col. Acrylamide alters cytoskeletal protein level in rat serum. Biomed Environ Sci 2013; 26(11):926-29.
83. McLean DL, Fan J, Higashijima S, Hale ME, Fetcho JR. A topographic map of recruitment in spinal cord. Nature 2007; 1(7131):71-5.
84. Xun-Chang F, Chao S, Hong-Wen G. Transmembrane transports of acrylamide and bisphenol A and effects on development of zebrafish (*Danio rerio*). J Hazard Mater 2010; 184:81-8.
85. Fernández D. Sistema Sensorial de Pez Cebra [Artículo en Linea] 2006. [consultado 27 Mayo 2014]. Disponible en: <http://pezcebradesarrollo.wordpress.com/sistemas-sensoriales-de-los-peces/>
86. Bichara D, Calcaterra NB, Arranz S, Armas P, Simonetta SH. Set-up of an infrared fast behavioral assay using zebrafish (*Danio rerio*) larvae, and its application in compound biotoxicity screening. J Appl Toxicol. 2013.
87. Selderslaghs IW, Hooyberghs J, De Coen W, Witters HE. Locomotor activity in zebrafish embryos: a new method to assess developmental neurotoxicity. Neurotoxicol Teratol. 2010; 32(4):460-71.