



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROPUESTA DE UN PROTOCOLO EN LA ESPECIE *Danio rerio* PARA LA EVALUACIÓN DE MOLÉCULAS CON ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE, OBTENIDAS A PARTIR DE MICROORGANISMOS FÚNGICOS, PARA EL TRATAMIENTO DE DIABETES MELLITUS TIPO II.

TESINA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

DIANA PRISCILA ARCOS DÍAZ



CIUDAD DE MÉXICO, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE
VOCAL
SECRETARIO
SUPLENTE 1
SUPLENTE 2


Profesor: Dra. Rachel Mata Essayag
Profesor: Dr. José Alberto Rivera Chávez
Profesor: Dra. Elia Brosla Naranjo Rodríguez
Profesor: Dr. Atonatiu Edmundo Gómez Martínez
Profesor: Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

LABORATORIO 2-5 y 2-6, DEPARTAMENTO DE PRODUCTOS NATURALES,
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

LABORATORIO 214 ORIENTE, INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM.

ASESOR DEL TEMA



Dr. JOSÉ ALBERTO
RIVERA CHÁVEZ

ASESOR TÉCNICO

MVZ. GILBERTO MORALES VILLAFANA

SUSTENTANTE



DIANA PRISCILA ARCOS DÍAZ

Agradecimientos

Al Comité Técnico del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el financiamiento autorizado a través del proyecto *Bioprospección de microorganismos fúngicos de hormigueros para el control de infecciones bacterianas fármaco resistentes* IA207422.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento autorizado a través del proyecto Ciencia de Frontera CF-2019-263977.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por mi formación profesional.

A mi tutor, Dr. José Alberto Rivera Chávez, por la oportunidad, las enseñanzas, los regaños, la perseverancia y la paciencia brindadas durante y después de la realización del proyecto.

Al Dr. Fernando López Casillas y al MVZ. Gilberto Morales Villafaña por brindar toda la infraestructura y la asesoría técnica necesaria para llevar a cabo el presente trabajo, también, por su paciencia y perseverancia.

A todos mis amigos del Laboratorio 2-5 y 2-6 del Instituto de Química de la UNAM, gracias por todo el apoyo y el aliento, en especial a Blanca, Enrique Aguilar, Enrique Serrano, Ingrid, Jade y Magaly, gracias por darme una estancia tan única en el IQ.

A Dani, Karla, Leyre, Xime, Yeni y Yulissa, gracias por acompañarme en todo momento durante y después de la carrera, gracias por su amistad única e incondicional.

Dedicatorias

Marilú †, gracias por guiarme y encaminarme a seguir mis dos grandes pasiones, la Química y la Danza.

Mis padres, Juan Carlos y Raquel Priscila Elizabeth, por todo el amor, apoyo y confianza, son mis dos grandes pilares, gracias por darme el legado más grande que pudiera recibir, mis estudios profesionales.

A mi hermana Karla, mi cuñado Juan Carlos y mi ahijada Samantha Nicole, por tanto amor incondicional.

A mis abuelitos, Anita †, Inocente † y Raquel, por su apoyo y amor durante toda mi vida, pero, sobre todo, por la hermosa familia que me otorgaron, gracias a la cual estoy logrando una de las metas más grandes de mi vida.

Mi prometido, Enrique Serrano, por aparecer en mi vida y quedarte en ella, por el acompañamiento, el apoyo, la paciencia y el amor.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE TABLAS.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Diabetes.....	1
1.2 Tipos de Diabetes.....	1
1.2.1 Diabetes Mellitus Tipo 1 (DMT1).....	2
1.2.2 Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2).....	2
1.2.3 Diabetes gestacional (DG).....	3
1.3 Panorama mundial de la DM.....	3
1.4 Diabetes en México	6
1.5 Modelos biológicos.....	7
1.5.1 Modelos biológicos utilizados para el estudio de la DMT2.....	7
1.6 <i>Danio rerio</i>	8
1.6.1 Características y propiedades de <i>Danio rerio</i>	8
1.6.2 Similitud entre el humano y <i>Danio rerio</i>	9
1.6.3 DMT2 en <i>Danio rerio</i>	10
1.6.4 El uso de <i>Danio rerio</i> en estudios de toxicidad y en el descubrimiento de nuevos fármacos.	11
2. OBJETIVOS	
2.1 Objetivo general.....	13
2.2 Objetivos particulares.....	13
3. PROCEDIMIENTO	
3.1 Modelo biológico.....	14
3.2 Anestesia.....	15
3.2.1 Agentes químicos.....	16
3.2.2 Agentes físicos	17
3.3 Vías de administración.....	17
3.3.1 Inmersión o absorción por mucosas.....	18
3.3.2 Administración oral.....	20
3.3.3 Administración intraperitoneal.....	21
3.4 Toma de muestra sanguínea.....	21
3.5 Selección de glucómetro.....	23
3.6 Curva de tolerancia a glucosa.....	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1 Modelo biológico: <i>Danio rerio</i>	
4.1.1 Crecimiento y mantenimiento.....	24

4.1.2 Características de la cepa obtenida.....	25
4.2 Anestesia.....	26
4.3 Toma de muestra sanguínea.....	27
4.4 Selección de glucómetro	30
4.5 Vías de administración	31
4.5.1 Inmersión o absorción por mucosas.....	31
4.5.2 Administración oral.....	33
4.5.3 Administración intraperitoneal (IP).....	34
4.6 Curva de tolerancia a glucosa (CTG).....	37
5. CONCLUSIONES.....	41
6. REFERENCIAS.....	42
7. APÉNDICE.....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cantidad total calculada de adultos entre 20 y 79 años con diabetes en el año 2021, calculada por la IDF (International Diabetes Federation, 2021).

Figura 2. Gasto total (USD) en salud relacionado con la diabetes en adultos de 20 a 79 años (International Diabetes Federation, 2021).

Figura 3. Gasto medio (USD) en salud relacionado con la diabetes, por persona, en adultos de 20 a 79 años (International Diabetes Federation, 2021).

Figura 4. Selección de glucómetro. División de grupos por glucómetro y por tratamiento.

Figura 5. Diagrama general del procedimiento para realizar la curva de tolerancia a glucosa.

Figura 6. Pez cebra de la cepa [TAB/WIK]/[AB/TU] de cuatro meses de edad.

Figura 7. Resumen ilustrativo del procedimiento de anestesia.

Figura 8. Microscopia de la punta del capilar cortado (aguja), abierto y con el bisel del tamaño adecuado para realizar la punción.

Figura 9. Dispositivo de toma de muestra.

Figura 10. Zona de punción (recuadro rojo). Para facilitar la localización de esta zona se utilizó luz incidente inferior y se colocó al pez en posición decúbito lateral.

Figura 11. Ingreso correcto del capilar. Se incidió en la zona de punción, al entrar en contacto con la aorta dorsal se comenzó a ver un llenado de sangre constante.

Figura 12. Selección de glucómetro. Gráfico obtenido de tomas de muestra sanguínea con los glucómetros marca (1) Contour Plus®, (2) Freestyle Xceed® y (3) Freestyle Optium Neo®.

Figura 13. Concentraciones obtenidas de glucosa en sangre posterior al tratamiento con 1.5% de glucosa por tres y cinco días.

Figura 14. Ilustración de la metodología de administración oral mediante un gránulo recubierto con alimento comercial. El gránulo debe de ser consumido en una sola intención.

Figura 15. Dispositivo de carga y descarga de la solución.

Figura 16. Proceso de carga de muestra. Para obtener la muestra se dejó un volumen de aire en la jeringa, posteriormente se acercó la punta del capilar a la gota de solución y se fue jalando el émbolo de la jeringa muy lentamente hasta que el volumen de la gota se cargó por completo y de manera uniforme. Para verificar que no hay residuos de solución en la tapa se utilizó la luz del microscopio.

Figura 17. Ubicación de la zona de punción para la vía de administración intraperitoneal en el recuadro rojo.

Figura 18. Administración intraperitoneal. Se colocó al organismo anestesiado en un sujetador, en posición decúbito dorsal, se ubicó la zona de punción y por ahí se ingresó el capilar ya cargado hasta llegar al peritoneo, para mejor visibilidad se utilizó luz incidente superior.

Figura 19. Curva de tolerancia a glucosa. Muestras obtenidas a tiempo cero, 25, 60 y 120 min. Se realizó la prueba *t* no pareada: (1) 0 min vs 25 min donde se obtuvo $[37.5 \pm 2.3 \text{ mg/dL}]$ y $[320.2 \pm 41.9 \text{ mg/dL}]$ respectivamente, $P < 0.0001^{****}$. (2) 0 min vs 60 min donde se obtuvo $[37.5 \pm 2.3 \text{ mg/dL}]$ y $[303.5 \pm 44.7 \text{ mg/dL}]$ respectivamente, $P < 0.0001^{***}$. (3) 0 min vs 120 min donde se obtuvo $[37.5 \pm 2.2 \text{ y } 184.8 \pm 35.8 \text{ mg/dL}]$ respectivamente, $P < 0.0021^{**}$.

Figura 20. Curva de tolerancia a glucosa. Muestras obtenidas a tiempo cero, 25 y 100 min. Se realizó la prueba *t* no pareada: (1) 0 min vs 25 min donde se obtiene $[37.3 \pm 1.3 \text{ mg/dL}]$ y $[329.5 \pm 25.7 \text{ mg/dL}]$ respectivamente, $P < 0.0001^{****}$. (2) 0 min vs 100 min donde se obtuvo $[37.3 \pm 1.3 \text{ mg/dL}]$ y $[288.4 \pm 25.3 \text{ mg/dL}]$ respectivamente, $P < 0.0001^{****}$. (3) 25 min vs 100 min donde se obtuvo $[329.5 \pm 25.7 \text{ mg/dL}]$ y $[288.4 \pm 25.33 \text{ mg/dL}]$ $P = 0.2735$.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Criterios de diagnóstico de diabetes (International Diabetes Federation, 2019).

Tabla 2. Estimaciones mundiales de diabetes en adultos de 20 a 79 años.

Tabla 3. Modelos biológicos para el estudio de DMT2 (Tubesha, 2017).

Tabla 4. Ejemplos de cribados publicados en peces cebra (MacRae & Peterson, 2015).

Tabla 5. Líneas WT reportadas en la plataforma ZFIN.

Tabla 6. Agentes anestésicos utilizados en peces cebra.

Tabla 7. Agentes anestésicos físicos y sus principales características.

LISTA DE ABREVIATURAS

TAG	Tolerancia anormal a la glucosa
AGA	Alteración de la glucosa en ayunas
mmol/L	milimol por litro, concentración
[mg/dL]	miligramos por decilitro, concentración
HbA1c	Hemoglobina glucosilada
DMT1	Diabetes Mellitus Tipo 1
DMT2	Diabetes Mellitus Tipo 2
DG	Diabetes gestacional
IDF	Federación Internacional de Diabetes, por sus siglas en inglés
USD	Dólar estadounidense
FMD	Federación Mexicana de Diabetes
A.C.	Antes de Cristo
ADME	Absorción, Distribución Metabolismo y Excreción
ZFIN	Zebrafish Information Network
ZIRC	Zebrafish International Resource Center
EZCR	European Zebrafish Resource Center
WT	Wild type, fenotipo silvestre, por sus siglas en inglés
IP	Intraperitoneal
MARD	Diferencia Relativa de la Media Absoluta, por sus siglas en inglés
SD	Desviación estándar
CV	Porcentaje de coeficiente de variación
CTG	Curva de tolerancia a glucosa
min	Minutos
MS-222	Metanosulfonato de tricaina
SNC	Sistema nervioso central
h	Horas
L	Litros
TGI	Tracto gastrointestinal

1. Introducción

1.1 Diabetes

La diabetes es una enfermedad crónica que se caracteriza por presentar niveles altos de glucosa en sangre (hiperglucemia). Esta característica se asocia a la ausencia o inadecuada producción de insulina por el organismo y/o a la incapacidad de utilizarla eficazmente (Katzung et al., 2012). Esta hormona se produce en el páncreas y participa en el transporte de la glucosa al interior de la célula donde se transforma en energía, y es fundamental para el metabolismo de las proteínas y las grasas. La hiperglucemia crónica puede ocasionar diversas complicaciones como las enfermedades cardiovasculares, neuropatía, nefropatía y afecciones oculares, estos padecimientos son incapacitantes y potencialmente mortales, de tal forma que su diagnóstico oportuno (**Tabla 1**), así como su tratamiento son de vital importancia (International Diabetes Federation, 2021).

Tabla 1. Criterios de diagnóstico de diabetes (International Diabetes Federation, 2021).

	Diabetes. Debe ser diagnosticada si se cumplen uno o más de los siguientes criterios	Tolerancia Anormal a la Glucosa (TAG). Debe ser diagnosticada si se cumplen ambos criterios	Alteración de la Glucosa en Ayunas (AGA). Debe ser diagnosticada si se cumplen el primero o ambos criterios
[Glucosa] en plasma en ayunas	≥ [7.0 mmol/L o 126 mg/dL] o	< [7.0 mmol/L o 126 mg/dL] Y	[6.1 a 6.9 mmol/L o 110 a 125 mg/dL] Y si se mide
[Glucosa] en plasma tras dos horas	≥ [11.1 mmol/L o 200 mg/dL] o	≥ [7.8 < 11.1 mmol/L o 140-200 mg/dL]	< [7.8 mmol/L o 140 mg/dL]
HbA1c	≥ [48 mmol/mol o 6.5%] o		
[Glucosa] en plasma aleatoria	≥ [11.1 mmol/mol o 200 mg/dL]		

1.2 Tipos de Diabetes

Se conocen tres tipos principales de diabetes mellitus, la tipo 1 (DMT1), la tipo 2 (DMT2) y la gestacional (DG). Algunos autores reconocen también la diabetes mellitus tipo 3, cuyo origen es diverso incluyendo defectos genéticos, páncreas exócrino, endocrinopatías, inducción química de diabetes, infecciones y formas poco comunes de diabetes inmuno-mediadas (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003). A continuación, se presenta una descripción de la DMT1, DMT2 y DG.

1.2.1 Diabetes mellitus tipo 1 (DMT1)

Esta enfermedad es causada por una reacción autoinmune en contra de las células β -pancreáticas, impidiendo que éstas sean capaces de generar insulina, provocando de esta manera un aumento en los niveles de glucosa sanguínea. La reacción autoinmune puede ser causada por factores genéticos y un desencadenante ambiental, por ejemplo: una infección viral, algunas toxinas o factores alimenticios (International Diabetes Federation, 2021).

Se diagnostica con mayor frecuencia en jóvenes y niños que presentan algunos o todos los siguientes síntomas: sed excesiva, visión borrosa, mojar la cama, micción frecuente, fatiga o falta de energía, hambre constante y pérdida de peso repentina; el diagnóstico clínico se realiza tomando en cuenta los parámetros mostrados en la **Tabla 1**.

La incidencia de esta enfermedad ha aumentado considerablemente con el paso de los años, esto se atribuye a factores no genéticos; es decir, a cambios ambientales relacionados con el estilo de vida tales como: el aumento de peso y la alimentación inapropiada en las etapas tempranas de crecimiento (International Diabetes Federation, 2021).

Para su tratamiento es indispensable reemplazar la insulina que no se produce mediante el uso de insulina exógena (vía subcutánea), ya que la ausencia de ésta puede causar cetoacidosis diabética e incluso la muerte (Katzung et al., 2012).

1.2.2 Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2)

La DMT2 es una enfermedad multi-génica que se caracteriza por la incapacidad de las células de responder correctamente a la insulina producida por el organismo, además de una deficiencia relativa de esta hormona, por ello también es conocida como “insulinorresistente”. En este caso, la hormona producida por el páncreas no es capaz de favorecer el transporte de glucosa al interior de las células, lo cual conlleva a un aumento en la producción de insulina y con el tiempo, se puede desarrollar una producción inadecuada de la misma a consecuencia del fracaso de las células beta pancreáticas para ajustarse a las demandas del cuerpo.

Se diagnostica más frecuentemente en adultos mayores, pero en la actualidad ya se reportan casos en adultos jóvenes y niños debido a los malos hábitos de alimentación y vida sedentaria, dos factores que aumentan los casos de sobrepeso y obesidad. La DMT2 es el tipo más común de diabetes y representa el 90% de los casos en el mundo.

La sintomatología presentada es variable y en algunos casos imperceptible debido a que la aparición de la enfermedad es menos drástica que en la DMT1. Un aspecto importante para su tratamiento es la modificación del estilo de vida, manteniendo un

peso corporal saludable, con actividad física regular y dieta saludable; en este padecimiento, no es necesario el uso de insulina exógena, pero es una opción también para mantener controlados los niveles de glucosa sanguíneos. Un paciente sin tratamiento para DMT2 puede caer en un coma hiperosmolar no cetósico, requiriendo atención médica inmediata (International Diabetes Federation, 2021; Katzung et al., 2012; The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003).

1.2.3 Diabetes gestacional (DG)

Se diagnostica por primera vez durante la etapa del embarazo y puede ocurrir en cualquier momento de este periodo, aunque con más frecuencia después de la semana 24. Esta enfermedad se presenta en mujeres cuya capacidad secretora de insulina no supera la reducida acción de la insulina provocada por la producción de hormonas de la placenta, es decir, que presentan resistencia a la insulina (International Diabetes Federation, 2021).

Los factores de riesgo para desarrollar DG son la edad avanzada (mayor a 30 años), sobrepeso y obesidad, haber presentado DG en embarazos previos, el aumento excesivo de peso durante esta etapa, índice de masa corporal mayor a 26, antecedentes familiares de diabetes, el síndrome de ovario poliquístico, tabaquismo y tener antecedentes de mortinatalidad o de haber dado a luz a un niño con enfermedad congénita (International Diabetes Federation, 2021; Pablo & Paredes, 2022).

Las mujeres que presentaron DG corren el riesgo de padecer DMT2 de tres a seis años después del embarazo con esta enfermedad, además de poder presentar complicaciones o desenlaces adversos del embarazo, como un bebé macrosómico, cetoacidosis, preeclamsia, parto prematuro, parto distócico, desgarros del canal blando del parto, disyunción de la sínfisis púbica, sangrado posparto y atonía uterina. Las complicaciones fetales abarcan el aborto, malformaciones congénitas, muerte perinatal, prematuridad, polihidramnios y crecimiento intrauterino retardado. Los bebés nacidos de madres que padecieron DG tienen mayor riesgo de padecer obesidad a lo largo de su vida y también desarrollar DMT2 (Bauzá Tamayo et al., 2022; International Diabetes Federation, 2021; Pablo & Paredes, 2022).

1.3 Panorama mundial

La diabetes afecta significativamente a la población mundial total, de acuerdo con los cálculos realizados por la IDF para el año 2021, se estimó que existen 537 millones de adultos entre 20 y 79 años con diabetes (**Figura 1**), previendo que esta cantidad aumente a 643 millones para 2030 y 783 millones para el año 2045.

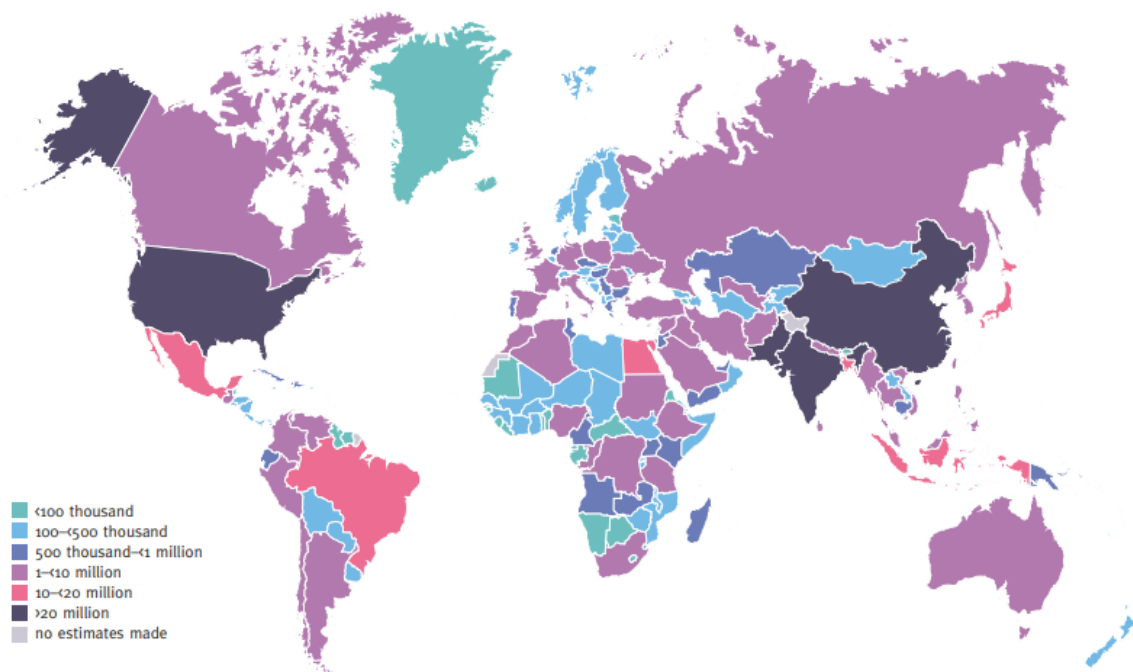


Figura 1. Cantidad total calculada de adultos entre 20 a 79 años con Diabetes en el año 2021 por la IDF (International Diabetes Federation, 2021).

La tendencia en el aumento de la DM que se observa a nivel mundial conlleva al incremento de los índices de prevalencia de la enfermedad, defunciones y gastos directos e indirectos ocasionados por el padecimiento. Las predicciones calculadas por la IDF se muestran en la **Tabla 2** (International Diabetes Federation, 2021).

Por otro lado, la diabetes genera costos directos e indirectos. Los costos directos se refieren a todo gasto en salud, independientemente de si este queda a cargo de los propios pacientes, contribuyentes privados o públicos o del gobierno, mientras que, los costos indirectos son los derivados del abandono de la mano de obra, mortalidad, absentismo y presentismo (Barraza-Lloréns, 2016; International Diabetes Federation, 2021).

El gasto total a nivel global a causa de esta enfermedad creció considerablemente del año 2007 al 2021, aumentando de 232 mil millones de USD a 966 mil millones de USD para adultos de 20 a 79 años. Para el año 2030 se alcanzará la cifra de 1.03 billones de USD y para el 2045 1.05 billones de USD.

La DM es una enfermedad de alta incidencia y mortalidad, además representa un costo total (**Figura 2**) e individual (**Figura 3**) importante a nivel mundial.

Tabla 2. Estimaciones mundiales de Diabetes en adultos de 20 a 79 años.

Descripción	2021	2030	2045
Total de población mundial	7.9 mil millones	8.6 mil millones	9.5 mil millones
Población adulta (20-79 años)	5.1 mil millones	5.7 mil millones	6.4 mil millones
Diabetes (20 a 79 años)			
Prevalencia mundial	10.5%	11.3%	12.2%
Número de personas con Diabetes	536.6 millones	642.7 millones	783.2 millones
Número de muertes por Diabetes	6.7 millones	-	-
Total, de gastos en salud para la Diabetes	966 billones de USD	1,028 billones de USD	1,054 billones de USD

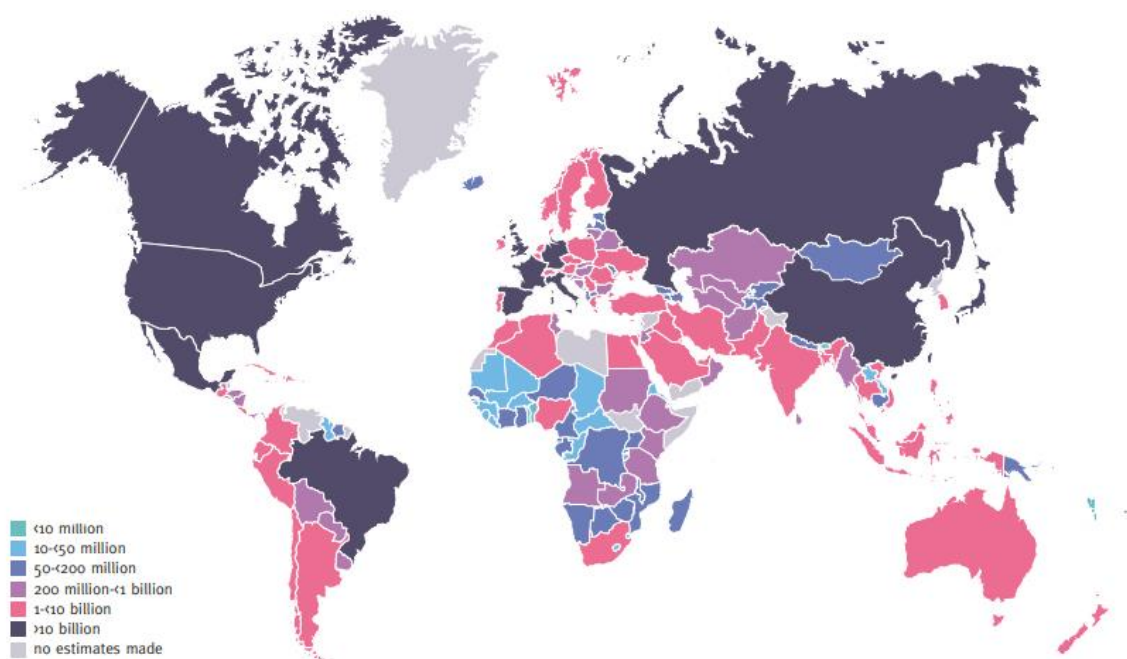


Figura 2. Gasto total (USD) en salud relacionado con la Diabetes en adultos de 20 a 79 años (International Diabetes Federation, 2021).

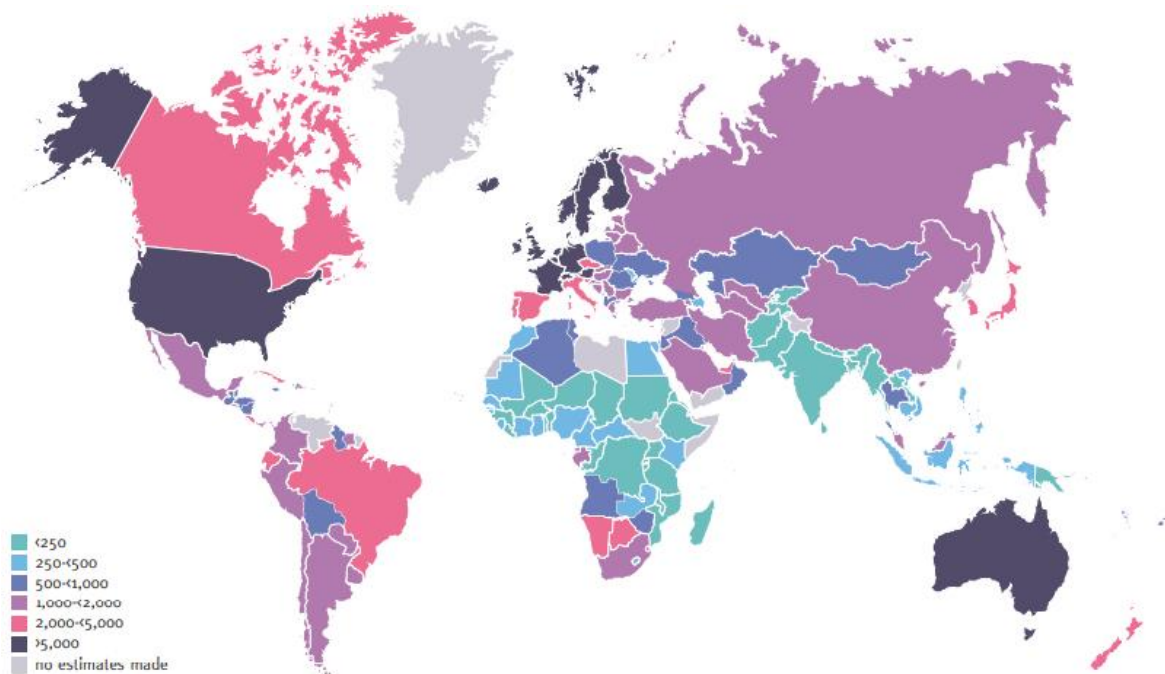


Figura 3. Gasto medio (USD) en salud relacionado con la diabetes, por persona, en adultos de 20 a 79 años (International Diabetes Federation, 2021).

1.4 Diabetes en México

Una mala alimentación, sobrepeso y obesidad son factores de riesgo para padecer diabetes, estos problemas son de alta prevalencia en México. De acuerdo con la Federación Mexicana de Diabetes (FMD), la DMT2 es la segunda causa de mortalidad en nuestro país, y de forma alarmante, las defunciones asociadas a este padecimiento continúan aumentando con el paso de los años. De acuerdo con la FMD para el año 2019 se calcularon entre 10 y 20 millones de casos de Diabetes en adultos de 20 a 79 años, siendo una de las cifras más altas a nivel mundial (**Figura 1**) (Federación Mexicana de Diabetes, 2022).

En cuanto a los costos, el gasto total relacionado a la diabetes en el año 2021 ascendió a más de 10,000 millones de dólares, mientras que el gasto medio por persona asciende a más de 5000 dólares (**Figura 2 y 3** respectivamente) siendo, para ambos casos, uno de los mayores costos a nivel mundial (Barraza-Iloréns, 2016; International Diabetes Federation, 2021).

Debido a la alta incidencia y mortalidad causada por DMT2 en México y a nivel mundial, es de vital importancia continuar con el desarrollo y descubrimiento de nuevos fármacos para la prevención y el tratamiento de esta enfermedad, para ello, la utilización de modelos biológicos constituye un elemento clave (Tubasha, 2017).

1.5 Modelos biológicos

El uso de animales como modelos biológicos en la investigación se ha reportado desde tiempos del filósofo Aristóteles (382-322 A.C); gracias a ello, se han realizado importantes aportaciones al estudio, tratamiento y cura de diversos padecimientos y también se han prevenido desenlaces fatales en el uso de nuevos xenobióticos con propiedades farmacológicas. Actualmente, el uso de animales en los laboratorios de investigación es un tema controversial, debido a que diversas asociaciones protectoras de animales se postulan en contra de la reproducción de especies con esta finalidad. Por ello, se encuentra rigurosamente regulado su uso bajo la campaña de las tres R's: reemplazar, reducir y refinar el uso de animales por otros modelos, reducir la cantidad de organismos utilizados por experimento y refinar los métodos utilizados para así minimizar dolor, angustia o estrés, y con ello mejorar el bienestar animal (Hajar, 2011).

Para que un organismo pueda ser considerado como un modelo biológico, debe de nacer y crecer bajo condiciones establecidas y ser mantenido bajo un ambiente controlado rigurosamente, en constante monitoreo, de manera que todos los factores genéticos y microbiológicos sean conocidos. Los roedores encabezan la lista de especies que son utilizadas en investigación biomédica gracias a su bajo costo, alto potencial reproductivo, corto periodo de vida y su adaptación a diferentes ambientes. El 99% de especies utilizadas son ratas, ratones, cobayos y conejos, mientras que en el 1% restante se encuentran perros, gatos y primates no humanos (Tubasha, 2017).

1.5.1 Modelos biológicos utilizados para el estudio de la DMT2

Se han desarrollado diversos modelos para el estudio de la DMT2, la gran mayoría de ellos son en roedores, algunos modelos se obtuvieron de forma espontánea (genética) o inducida, ya sea por, agentes químicos, dieta, manipulaciones quirúrgicas o combinaciones de estas estrategias, de forma que sus características pudieran reflejar la fisiopatología de la enfermedad, el desarrollo natural de diabetes o el desarrollo de complicaciones de la enfermedad con una etiología similar a la que se presenta en humanos afectados por este padecimiento (Tubasha, 2017). Algunos de los modelos más empleados se resumen en la **Tabla 3**.

En años recientes se ha propuesto a *Danio rerio* como especie modelo para el estudio de la DMT2, gracias a que presenta diversas ventajas sobre el uso de roedores en el campo de la investigación.

Tabla 3. Modelos biológicos para el estudio de DMT2 (Tubesha, 2017).

Modelos obesos	
Modelos monogénicos	Ratones <i>ob/ob</i> Ratones <i>db/db</i> Rata diabética Zucker
Modelos poligénicos	Ratones <i>KK</i> y <i>KK-Ay</i> Ratones obesos Nueva Zelanda Ratones <i>TALLYHO/Jng (TH)</i> Rata Otsuka Long Evans Tokushima.
Modelos no obesos	
Ratas Goto-Kakizaki Ratas Torii (SDT)	Rata diabética Cohen Rata Wistar Bonn / Kobori (<i>WBN/Kob</i>)
Modelos inducidos por dieta/nutrición	
Rata <i>Psammomysobesus</i> <i>Tuco-Tuco</i>	Ratones <i>Acomysahirinus</i>
Modelos inducidos por agentes químicos	
Ratones obesos tratados con GTG Modelos adultos Estreptozotocina/Aloxano	Modelos neonatales Estreptozotocina/Aloxano Modelos Nictinamida/Estreptozotocina
Modelos inducidos mediante intervención quirúrgica	
Modelo con pancreatectomía parcial	Ratas diabéticas VMH

1.6 *Danio rerio*

El pez cebra es un organismo teleósteo de la familia *Cyprinidae*; su uso como modelo de laboratorio se encuentra registrado desde el año de 1981 por Streisinger y colaboradores quienes reportaron la realización del primer cribado genético de mutaciones que afectan al desarrollo de órganos de un vertebrado; desde entonces se han ampliado los campos de aplicación de este modelo a líneas de investigación como son la biología del desarrollo, toxicología, descubrimiento de fármacos, modelo de enfermedades y neurobiología (de Souza Anselmo et al., 2018), todo esto gracias a sus características.

1.6.1 Características y propiedades de *Danio rerio*

El pez cebra cuenta con diversas características y propiedades que lo hacen una alternativa viable al uso de modelos mamíferos, algunas de ellas son: (1) es un organismo intacto que presenta características de desarrollo, anatomía y fisiología similares a las de vertebrados superiores; (2) son organismos que pueden absorber mutágenos químicos a través del agua (de Souza Anselmo et al., 2018); (3) los embriones miden alrededor de 10 mm y, para ensayos de toxicidad, se requieren muy pequeñas cantidades de compuesto, además los ensayos se pueden realizar en placas de 96 pozos (Mandrekar & Thakur, 2009); (4) los peces pueden ser manipulados genéticamente con facilidad (de Souza Anselmo et al., 2018; Schlegel & Gut, 2015); (5) el mantenimiento de los peces es más fácil y menos costoso que el de los múridos más utilizados (de Souza Anselmo et al., 2018; Mandrekar & Thakur, 2009; Schlegel & Gut, 2015), en una pecera del tamaño de una jaula para ratones se pueden tener hasta 30 peces de dos a tres centímetros de largo (Gut et al., 2017); (6) los embriones son transparentes, se desarrollan de forma externa y

rápida en comparación con los mamíferos más utilizados en las pruebas tradicionales, además presentan alta capacidad de reproducción; (7) la progenie obtenida de una cruce puede resultar en cientos de huevos fertilizados que se desarrollan rápidamente en larvas con órganos metabólicos funcionales (de Souza Anselmo et al., 2018; Dorsemans et al., 2017; Gut et al., 2017; Mandrekar & Thakur, 2009; Schlegel & Gut, 2015; Yoganantharjah & Gibert, 2017).

Una de las áreas en la que actualmente se está implementando el uso de este organismo es en el descubrimiento de nuevas moléculas o compuestos con actividad terapéutica. Esta área en particular implica diferentes retos ya que, la gran mayoría de moléculas no pasan más allá de los ensayos preclínicos debido a que no cumplen con los estándares del proceso ADME (Yoganantharjah & Gibert, 2017). Estos ensayos representan una alta inversión tanto económica como de tiempo; el uso del pez cebra en estos ensayos disminuye significativamente los costos y el tiempo de análisis gracias a las características mencionadas anteriormente; por otro lado, dichos ensayos pueden ser realizados y extrapolados a enfermedades presentes en humanos gracias al amplio parecido entre estas especies.

1.6.2 Similitud entre el humano y *Danio rerio*

Además de las ventajas mencionadas anteriormente, existe una alta similitud entre el pez cebra y el humano, por ejemplo, se conoce que los peces cebra comparten características fisiológicas, morfológicas e histológicas con los mamíferos, los órganos presentes en el pez cebra llevan a cabo la misma función que los correspondientes en los humanos, además, la fisiología se encuentra altamente conservada (de Souza Anselmo et al., 2018). El páncreas del pez cebra contiene islotes que comprenden células α , β , δ y ϵ que regulan la homeostasis de la glucosa mediante la secreción del glucagón, insulina, somatostatina y grelina; el sistema hematopoyético se compone de los mismos tipos de células, eritrocitos, neutrófilos, eosinófilos, linfocitos y macrófagos; la fisiología cardiovascular está altamente conservada a nivel anatómico, celular y de biología de membranas (MacRae & Peterson, 2015).

La secuenciación del genoma del pez cebra reveló que aproximadamente el 70% de genes del humano tienen un ortólogo en el pez (~47% de los genes tienen un único ortólogo y ~24% de los genes tienen más de un ortólogo), además, aproximadamente el 82% de los genes relacionados a enfermedades tienen, al menos, un gen ortólogo en el pez cebra (de Souza Anselmo et al., 2018; Mandrekar & Thakur, 2009), también, se observa el fenotipo clínico característico de estas enfermedades en humanos (Gut et al., 2017). Los genes y proteínas responsables de la regulación del metabolismo de la glucosa han sido identificados y se ha demostrado que presentan patrones de regulación similares en peces cebra y mamíferos (Zhang et al., 2018).

1.6.3 DMT2 en *Danio rerio*

Para el estudio de DMT2 se han propuesto diferentes modelos utilizando al pez cebra, esto gracias a que el metabolismo de la glucosa y las vías de secreción de la insulina así como de resistencia son muy similares a los presentes en humanos (Schlegel & Gut, 2015; Zang et al., 2017). De la misma manera que en modelos murinos, en *D. rerio* se ha inducido DM por administración de estreptozotocina, tóxica para las células β -pancreáticas, causando hiperglicemia persistente por tres semanas e incrementando los niveles de proteínas glicosiladas en suero. Otro modelo para inducir DM consiste en colocar organismos, de dos años, a una exposición constante a una solución glucosada, esta exposición causa problemas de visión y una degeneración selectiva de los fotorreceptores del cono. Además se ha observado un agrandamiento de la membrana basal de las células endoteliales, uniones estrechas interrumpidas y un engrosamiento general de los vasos, similar a las características histológicas de la retinopatía en humanos (Schlegel & Gut, 2015). Otros modelos experimentales incluyen aquellos basados en dietas con elevados contenidos calóricos o por sobrealimentación, los cuales además de presentar hiperglicemia presentan marcadores de obesidad. Por otra parte, los modelos con deficiencia del receptor de leptina muestran niveles altos de insulina postprandial y un defecto en la cicatrización de heridas al igual que en pacientes diabéticos (en este caso el animal utilizado en este modelo no padece obesidad ni hiperglicemia). Este modelo podría indicar que la función de la leptina en la homeostasis de la glucosa es similar en el pez cebra y en los mamíferos, pero en la primera especie no afecta su adiposidad. Se conoce también una línea de pez cebra transgénico el cual presenta resistencia a la insulina en músculo esquelético. Estos organismos presentan niveles de glucosa alterados, así como intolerancia a la glucosa cuando son sobrealimentados (Heckler & Kroll, 2017).

La inducción de hiperglicemia, mediante las diferentes metodologías mencionadas y otras más, en esta especie hacen del pez cebra un modelo apto para el estudio de la fisiopatología de la DMT2, así como sus complicaciones, tales como nefropatía, retinopatía, neuropatía, curación de heridas retardada, mineralización ósea, producción de metilglioxal y especies reactivas de oxígeno, además de alteraciones genéticas; (Heckler & Kroll, 2017).

Por otro lado, el uso de fármacos conocidos para el tratamiento actual de la DMT2, como metformina y glimepirida han demostrado resultados satisfactorios disminuyendo los niveles de glucosa en sangre de estos organismos (Heckler & Kroll, 2017; Zang et al., 2017).

1.6.4 El uso de *Danio rerio* en la toxicología y en el descubrimiento de nuevos fármacos

Otro campo de estudio importante en el cual el pez cebra ha emergido como un modelo importante es en la toxicología y en el descubrimiento de nuevos fármacos gracias a sus características que les permiten cumplir con los principales desafíos que presentan estos campos; es decir, la identificación de nuevos blancos moleculares, encontrar nuevos usos terapéuticos a fármacos ya existentes, así como evaluar su toxicidad y eficacia *in vivo* (Gut et al., 2017). La principal característica distintiva de este modelo se centra en sus etapas tempranas de crecimiento (embriones y larvas) donde el tamaño del organismo le permite ser contenido en un volumen pequeño y por ello la cantidad del fármaco requerida para realizar esta evaluación es de algunos nanogramos (Mandrekar & Thakur, 2009), por un lado. Por otro lado, estudios recientes han revelado que el pez cebra presenta mecanismos generales de defensa, equivalentes a los presentes en mamíferos, en contra de xenobióticos (inducción de enzimas, estrés oxidante), así como, los circuitos de retroalimentación homeostática que controlan el metabolismo. Estas manifestaciones validan el uso de este organismo en pruebas toxicológicas y el descubrimiento de nuevos fármacos (Schlegel & Gut, 2015; Zang et al., 2011).

Durante el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos provenientes de fuentes naturales, la evaluación de la toxicidad es un paso principal. En los últimos años este modelo animal ha sido especialmente útil en el cribado de compuestos con actividad teratogénica, cardiotoxica, neurotóxica, hepatotóxica, nefrotóxica y genotóxica (Mandrekar & Thakur, 2009) entre otros (**Tabla 4**). Los cribados toxicológicos en este organismo combinan la escala y rendimiento de los modelos *in vitro* así como la complejidad fisiológica de un organismo vertebrado completo (de Souza Anselmo et al., 2018); además aceleran significativamente el tiempo de análisis *in vivo* (Yoganantharjah & Gibert, 2017).

El pez cebra se ha convertido en un modelo importante para el estudio del metabolismo y el modelo de enfermedades metabólicas (Schlegel & Gut, 2015). En el caso de la DMT2, estos modelos son aptos para realizar la elucidación de mecanismos de la fase temprana de la enfermedad y se han utilizado para el descubrimiento de fármacos de acuerdo con el fenotipo presentado (Zang et al., 2017). Además, ha sido posible la realización de estudios de dosis de fármacos, las cuales pueden ser extrapoladas a modelos de roedores, así como a otros mamíferos (Chaudhari et al., 2013).

Tabla 4. Ejemplos de cribados publicados en peces cebra (MacRae & Peterson, 2015).

Tipo de cribado	Referencia
Cardiotoxicidad	19
Supresores de la coartación aórtica	68
Supresores de defectos mitóticos	69
Hematopoyesis	40
Regeneración de tejido	77
Angiogénesis	78
Embriogénesis	44
Supresores de ototoxicidad	50
Supresores de leucemia	52
Vía del gen reportero FGF	79
Supresores de la enfermedad de riñón poliquístico	70
Conducta del sueño	72
Comportamiento	73
Absorción de lípidos de la dieta	80
Modificadores de la homeostasis del cobre	81
Angiogénesis	82
Supresores del síndrome QT largo	55
Supresores de melanoma	83
Aprendizaje	74
Gen reportero fluorescente	84
Inductores de la diferenciación de células β	85
Embriogénesis	86
Regeneración de células del cabello	87
Modificadores de la cardiomiopatía hipertrófica	88
Toxicología	89
Supresores de leucemia	90
Gen reportero de la luciferasa	91
Supresor de toxicidad de organofosfatos	92
Moduladores de la gluconeogénesis	12
Comportamiento	28
Supresores de la toxicidad del cianuro	93
Migración leucocitaria	94
Modificadores de la actividad de RAS	95
Embriogénesis	58
Embriogénesis	96
Supresores del síndrome de Dravet	71
Embriogénesis	97
Supresores de leucemia	57
Desarrollo craneofacial	98
Supresores de cáncer Wnt-activado	99
Supresores de cardiomiopatía	30
Estimuladores de la proliferación de células β	100
Supresores de cardiomiopatía	29
Modificadores de la homeostasis de la glucosa	101
Embriogénesis	102
Migración celular	103
Generación de tumores	104
Trasplantes en adultos	105
Gen reportero fluorescente	106

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Diseñar una propuesta de protocolo en un modelo *in vivo*, *Danio rerio*, para la evaluación de metabolitos secundarios aislados de microorganismos fúngicos como posibles fármacos con actividad hipoglucemiante.

2.2 Objetivos particulares

- Establecer las condiciones de crecimiento y mantenimiento de los peces cebras en laboratorio.
- Obtener la cepa con características adecuadas para la metodología propuesta.
- Estandarizar materiales y metodología de anestesia.
- Estandarizar el método, volúmenes, materiales e instrumentos necesarios para las administraciones, así como la toma de muestra sanguínea.
- Establecer la dosis de glucosa necesaria para generar un estado de hiperglucemia en peces cebras.
- Determinar la homeostasis de glucosa en el modelo *in vivo* a través de curvas de tolerancia a la glucosa.

3. Procedimiento

Se realizó una búsqueda bibliográfica exhaustiva sobre el modelo biológico *Danio rerio*, así como de protocolos y metodologías para la administración de fármacos en la especie. Posteriormente, con la información obtenida se propusieron diferentes metodologías de anestesia, administración por inmersión o absorción por mucosas, administración oral, administración intraperitoneal y toma de muestra sanguínea para cumplir con los objetivos del presente estudio.

Todos los protocolos estandarizados y realizados en el presente trabajo se realizaron bajo la aprobación del CICUAL FLC197-22 correspondiente a las instalaciones del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, además de seguir los lineamientos presentados por Zang et al., 2011, 2013, 2015, 2017 aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Mie Tsu, Japón, realizados de acuerdo con la regulación japonesa de bienestar animal "Ley de Bienestar y Manejo de Animales" (Ministerio de Medio Ambiente de Japón) y cumplieron con las directrices internacionales (Zang et al., 2015).

En lo subsecuente, para evitar redundancia en el texto se utilizarán como sinónimos peces, organismos, animales y sujetos experimentales para referirse al pez cebra.

3.1 Modelo biológico

De acuerdo con la Zebrafish Information Network (ZFIN) la cual conjunta información del Zebrafish Information Resource Center (ZIRC) así como del European Zebrafish Resource Center (EZCR), se conocen una gran cantidad de líneas Wild type (WT) (**Tabla 5**), todas ellas han sido y son utilizadas como modelos biológicos para diversas investigaciones. La selección de las cepas se realiza de acuerdo con los atributos que se requieran en el procedimiento a desarrollar. (Oregon University, 2022).

El grupo de investigación del Dr. Fernando López Casillas, en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM, cuenta con algunas de estas líneas de peces cebra, bajo el cuidado de un especialista. Con su colaboración, se seleccionaron dos líneas, TAB/WIK y AB/TU con la finalidad de realizar una cruce para obtener una cantidad adecuada de organismos con las características ideales para su manejo y uso en el presente trabajo.

Tabla 5. Líneas WT reportadas en la plataforma ZFIN.

Líneas WT de peces cebra	
<i>AB</i>	<i>SPF 5-D</i>
<i>AB/C32</i>	<i>SPF AB</i>
<i>AB/EKW</i>	<i>NA</i>
<i>ABO</i>	<i>NHGRI-1</i>
<i>AB/TL</i>	<i>RW</i>
<i>AB/TU</i>	<i>SAT</i>
<i>C32</i>	<i>SING</i>
<i>CB</i>	<i>SJA</i>
<i>KOLN</i>	<i>SJD</i>
<i>DAR</i>	<i>SJD/C32</i>
<i>EKW</i>	<i>TU</i>
<i>HK/AB</i>	<i>TL</i>
<i>HK/SING</i>	<i>TLN</i>
<i>HK</i>	<i>WIK</i>
<i>IND</i>	<i>WIK/AB</i>
<i>INDO</i>	<i>WT</i>

3.2 Anestesia

La realización de un proceso anestésico se requiere siempre que se realicen procedimientos invasivos en un modelo biológico. La anestesia se define como un estado reversible de depresión de la actividad eléctrica del sistema nervioso central (SNC), caracterizado por pérdida de la consciencia (hipnosis), de la sensibilidad (analgesia), de la actividad refleja (protección neurovegetativa) y de la motilidad (relajación muscular) (Velasco Martin et al., 2008), esto con el fin de evitar cambios fisiológicos o de comportamiento de los modelos, debidos a la exposición a situaciones de estrés o dolor, lo cual conlleva a la obtención de resultados no fidedignos.

Un agente anestésico debe seleccionarse de acuerdo con los requerimientos experimentales y, además, para peces, debe cumplir con las siguientes características:

- a. Ser fácil de administrar y presentar efectividad al exponer al organismo a una dosis baja.
- b. Tener la capacidad de inducir el estado de sedación o anestesia en menos de tres min. y sometiendo al organismo al mínimo estrés.
- c. Proporcionar inmovilización y analgesia eficaz durante todo el procedimiento.
- d. Favorecer una rápida recuperación del estado de anestesia, dentro de los primeros cinco minutos.
- e. Generar pocos o ningún cambio en su comportamiento o fisiología durante o después de la anestesia (Martins et al., 2016).

Idealmente, un agente anestésico debe ser asequible, práctico de usar y seguro para el operador; actualmente se conoce el uso tanto de agentes químicos como físicos.

3.2.1 Agentes químicos

Son los medios más utilizados, los fármacos pueden ser para uso veterinario o humano, generalmente se utilizan anestésicos locales y generales. El fármaco más utilizado en los peces cebras es la triclaína o MS-222, su efecto y el de otros agentes químicos se resumen en la **Tabla 6** (Martins et al., 2016; Vargas-Vargas, 2017).

Tabla 6. Agentes anestésicos utilizados en peces cebras.

Agente anestésico	Características
MS-222 (Triclaína)	Es un anestésico local inhalatorio, mayoritariamente se absorbe por las branquias, se administra en el medio e induce anestesia general, aunque también se utiliza para eutanasia. Actúa bloqueando principalmente los canales de sodio, afectando la actividad eléctrica neuronal, así como al músculo esquelético y cardíaco. Tiene potencial efecto cardiotoxico.
Eugenol (Aceite de clavo)	Anestésico inhalatorio, se mezcla con etanol para ser soluble en agua, es de rápida inducción de anestesia, pero el tiempo de recuperación es más largo que el de la triclaína. Es de amplio margen de seguridad.
Metomidato y Etomidato	Son hipnóticos no barbitúricos, y son utilizados como anestésicos inhalatorios en peces. Inducen efectos anestésicos y de recuperación rápidos. Se utiliza en procedimientos menores. Altera la fisiología de los peces suprimiendo la producción de cortisol.
Lidocaína	Es un anestésico local y analgésico. Presenta su efecto anestésico en un minuto mientras que la recuperación tarda de tres a cuatro min. Se utiliza en procesos mayores en combinación con otros agentes, no es recomendable aumentar la dosis ya que presenta una ventana terapéutica estrecha.
Propofol	Anestésico sedante-hipnótico. Se metaboliza rápidamente y también presenta recuperación rápida. No es totalmente soluble en agua.
Ketamina	Induce anestesia disociativa con algo de analgesia. Su uso depende de la especie, ya que puede causar apnea, recuperación prolongada y excitación. Presenta neurotoxicidad en larvas de pez cebra, además interfiere con el desarrollo de embriones.
Isoflurano	Hipnótico volátil. Se reportan estados de anestesia profunda y sobredosis. Por su naturaleza debe manejarse en campana de extracción para evitar daño al operador.

(Martins et al., 2016; Vargas-Vargas, 2017).

El uso de combinaciones de estos agentes favorece el efecto anestésico además de disminuir la toxicidad por aumentos de dosis. La selección adecuada depende de la naturaleza del procedimiento que se va a realizar.

3.2.2 Agentes físicos

Otra forma de inducir el estado anestésico es por medio de agentes físicos, los más empleados son la hipotermia o crio-anestesia, y la electroestimulación. Las características principales de ambos métodos se resumen en la **Tabla 7** (Vargas-Vargas, 2017).

Tabla 7. Agentes anestésicos físicos y sus principales características.

Electroestimulación	Crioanestesia o hipotermia
Es el método menos empleado. Se realiza tanto con corriente directa (12 V, 30–150 mA) como con corriente alterna (110–220 V). Se reporta que la corriente directa genera anodotaxis (movimiento hacia el polo negativo), electronarcosis y tetania mientras que la corriente alterna produce electronarcosis y tetania. La exposición prolongada puede generar daños a nivel de órganos y tejidos internos.	Estudios reportan que la inmersión de peces en agua a 4°C reduce la actividad motora. El efecto anestésico es moderado e incluye disminución del movimiento y disminución de la sensibilidad. Su combinación con fármacos anestésicos permite reducir la dosis de los fármacos lo que reduce la toxicidad. A temperaturas menores a 10°C puede afectar el metabolismo y la actividad de algunos órganos y sistemas.

Con la finalidad de cumplir los objetivos planteados en el presente trabajo, se eligió realizar la crio-anestesia o hipotermia para desarrollar las metodologías resumidas a continuación.

3.3 Vías de administración

El ingreso de xenobióticos al interior de los organismos se puede lograr tras la administración por diferentes vías, por ejemplo, la administración oral, la administración intraperitoneal y la inmersión o absorción por mucosas.

Su selección varía de acuerdo con los requerimientos experimentales, para este trabajo se requiere la implementación de la vía oral, la vía de administración intraperitoneal y la absorción por mucosas para evaluar xenobióticos con potencial hipoglucemiante.

3.3.1 Inmersión o absorción por mucosas

La vía de absorción por mucosas es la más utilizada para exponer a los organismos a diferentes moléculas, la forma en que se lleva a cabo es mediante la osmorregulación, lo cual implica una constante ganancia de agua como resultado de una mayor concentración de sal dentro del organismo en comparación con su entorno de agua dulce, este ingreso constante de agua permite la absorción de moléculas presentes en el medio (Capiotti et al., 2014).

Algunos de los protocolos reportados actualmente presentan una considerable variabilidad en los parámetros que establecen para sus tratamientos, por ejemplo, la cantidad de organismos por tanque o por litro (Capiotti et al., 2014; Connaughton et al., 2016; Dorsemans et al., 2017; Gleeson et al., 2007), los protocolos de alimentación (Connaughton et al., 2016; Gleeson et al., 2007), los tiempos de exposición (Capiotti et al., 2014; Connaughton et al., 2016; Dorsemans et al., 2017; Gleeson et al., 2007; Luo et al., 2019), las concentraciones de un mismo analito (Capiotti et al., 2014; Connaughton et al., 2016; Dorsemans et al., 2017; Gleeson et al., 2007; Luo et al., 2019), entre otras. Por otro lado, gran parte de ellas concuerdan en que la vía de absorción por mucosas es la más adecuada para evaluar los efectos de una exposición crónica (1 y 2 meses, respectivamente Connaughton et al., 2016; Gleeson et al., 2007) , así como el método más fácil y conveniente para la administración de fármacos (Luo et al., 2019).

En la literatura existen distintos reportes de modelos farmacológicos que emplean *Danio rerio* y la absorción por mucosas como vía de administración para el estudio de tratamientos alternativos para la DM. Sin embargo, no existe un protocolo definido, todas las opciones presentan variabilidad en diversos parámetros tales como el tiempo de inmersión (Capiotti et al., 2014; Connaughton et al., 2016; Dorsemans et al., 2017; Gleeson et al., 2007; Luo et al., 2019), la concentración de glucosa (Capiotti et al., 2014; Connaughton et al., 2016; Dorsemans et al., 2017; Gleeson et al., 2007), la edad de los organismos (Connaughton et al., 2016) y la alimentación (Connaughton et al., 2016; Gleeson et al., 2007); a continuación, se resumen de algunos de ellos.

- 1. Tiempo de inmersión:** Se evaluó la inmersión constante y la inmersión alternada. Para el primer caso se colocaron poblaciones WT y AB a nadar en una solución de glucosa al 1% por 30 y 32 días respectivamente, dos peces fueron sacrificados cada 24 h para determinar la concentración de glucosa en sangre, los niveles basales fueron de $[74 \pm 8.5 \text{ mg/dL}]$ para los peces WT, mientras que para los AB fue de $[89.0 \pm 10.6 \text{ mg/dL}]$; ninguna población fue alimentada durante el experimento para prevenir el aumento de glucosa en el medio debido al alimento. Se obtuvo un incremento transitorio de los niveles de glucosa en sangre a un valor de aproximadamente $[400 \text{ mg/dL}]$ a los dos días del inicio de la exposición, y posteriormente, estos niveles disminuyeron considerablemente, aunque no hasta los niveles basales. La

concentración de glucosa en el medio provocó un incremento en la mortalidad.

En el caso de la inmersión alternada, se colocaron poblaciones WT y AB a nadar en una solución de glucosa dos y cero por ciento (sin glucosa en el medio), alternando estas soluciones cada 24 h; se tomaron muestras iniciales de cinco peces WT y cuatro AB cada 24 h por los primeros cuatro (WT) y cinco (AB) días, posteriormente se realizó el muestreo cada tres días hasta el día 30-32. Los resultados mostraron que los organismos presentaron hiperglucemia posterior a la exposición a la solución de glucosa al 2%. A medida que progresó el estudio, estos niveles disminuyeron ligeramente. Por lo tanto, a través de este protocolo se pudo inducir y mantener la hiperglucemia (Gleeson et al., 2007).

2. **Edad del organismo:** En este protocolo, se realizó una comparación entre peces adultos (uno a tres años) y peces jóvenes (cuatro a siete meses), se utilizó el protocolo de inmersión alternada presentado en el punto anterior. Antes de iniciar los experimentos se tomaron datos de glucosa en sangre y peso seco como dato pre-experimental. El protocolo se llevó a cabo por dos meses, todos los días se monitorearon los parámetros del agua y los organismos fueron alimentados cada vez que su medio mostraba cero % de glucosa. Posterior a dos, cuatro, seis y ocho semanas de tratamiento (siete semanas para los peces jóvenes) cuatro o cinco peces por grupo de edad fueron sacrificados para monitorear los niveles de glucosa sanguíneos, la muestra se tomó 48 h después de su última alimentación, encontrándose que la glucosa aumentó significativamente ($\alpha = 0.05$; $p \geq 0.014$) a las cuatro semanas del tratamiento. Este experimento indicó que los organismos jóvenes se adaptan al medio en el que se encuentran; por ello, se realizó una modificación con peces en edad de cinco a 11 meses. El protocolo consistió en un aumento de una unidad de porcentaje de glucosa cada dos semanas hasta terminar los dos meses de tratamiento, es decir, de la semana cero a la dos la concentración de glucosa fue de 1%, de la semana dos a la cuatro aumentó a dos 2% y a partir de la semana seis a la ocho se dividió a la población en tres grupos. El primero se mantuvo con 2% de glucosa, el segundo aumento a 2.5 % de glucosa y el tercero aumento a 3%. Todos los tratamientos se realizaron con el protocolo de exposición alternada, cambiando de 24 h en glucosa a su tratamiento correspondiente y posteriormente 24 h con 0% de glucosa. El aumento significativo se encontró en el protocolo de cambio de 1, 2 y hasta 3 % de concentración. Se observó que este tipo de aumentos se requieren para inducir y mantener la hiperglucemia en peces jóvenes (Connaughton et al., 2016).
3. **Concentración del carbohidrato:** En un tercer experimento, se realizó la inmersión de una población de organismos en glucosa a tres concentraciones, [55.5, 111 y 166 mM], así como un grupo control. Quince organismos por grupo se alimentaron tres veces al día con alimento

comercial y *Artemia salina* Leach. Las soluciones de glucosa se cambiaron tres veces por semana para evitar contaminación microbiana. Los grupos presentaron una mortalidad de 30%, 20% y 40% respectivamente. De acuerdo con los resultados obtenidos se seleccionó el grupo de [111 mM] para la correcta inducción de la hiperglucemia. Posterior a los 14 días los organismos se colocaron en agua sin glucosa por 7 días más, pasado este tiempo, se realizó la toma de muestra sanguínea en la cual aún mostraron niveles altos de glucosa. Con ello se concluyó que por medio de esta metodología se puede inducir y mantener la hiperglucemia (Capiotti et al., 2014).

4. La cuarta metodología revisada consiste en un protocolo de inmersión crónica en solución con glucosa [111 mM], como se presentó anteriormente. Por cada dos L de agua se colocan de cinco a siete organismos por 14 días, posteriormente, la solución se cambia cada dos días para evitar contaminación microbiana. Transcurridos los días de tratamiento se colocan los organismos en agua sin glucosa por un tiempo breve, después se realiza la toma de muestra sanguínea. Mediante este protocolo se pudo inducir y mantener la hiperglucemia (Dorsemans et al., 2017).

Con base en la revisión bibliográfica realizada, en este trabajo se propone un protocolo de inmersión de peces cebras jóvenes en una solución de glucosa, el procedimiento detallado y resultados obtenidos se muestran en la siguiente sección.

3.3.2 Administración oral

La vía de administración oral se utiliza en diversos modelos biológicos para el estudio del efecto de xenobióticos, ya que es muy accesible y poco invasiva.

Algunas metodologías empleadas para la administración oral de peces cebras contemplan la generación de gránulos de gluten, con un tamaño de 700 μm , impregnados con diferentes moléculas. Por su consistencia, estos gránulos flotan en la superficie, hasta 30 min. manteniendo su forma antes de ser consumido por los organismos. La absorción de las sustancias se monitorea al determinar su concentración plasmática. Este experimento demuestra que las sustancias de prueba se absorben más en comparación con aquellas administradas por absorción por mucosas (Zang et al., 2011). Otros estudios proponen la utilización de una sonda 22-G (Collymore et al., 2013) o una punta pequeña de micropipeta (Banote et al., 2013; Kulkarni et al., 2014; Zang et al., 2017), para depositar la solución de interés directamente en el TGI, ambos procedimientos requieren de anestesia con MS-222, además de la verificación visual de la correcta administración, es decir, que la solución no salga de la boca u opérculos del organismo durante la recuperación.

Con la información obtenida, para este protocolo se propuso estandarizar la metodología ya sea utilizando la administración con punta de micropipeta o generando gránulos.

3.3.3 Administración intraperitoneal

La vía de administración intraperitoneal es una alternativa efectiva y reproducible para evaluar la exposición aguda a diversas moléculas, se puede realizar en un tiempo aproximado de tres a cuatro min. (Samaee et al., 2017), es un método útil para las moléculas que no pueden ser evaluadas por medio del método de inmersión (absorción por mucosas) ya sea por ser insolubles en agua, tener una muy pequeña cantidad de fármaco y/o que éste sea muy costoso o que se requiera tener un mayor control de la cantidad de fármaco administrado por organismo (Kalueff & Cachat, 2011).

Para la implementación de esta vía se han propuesto algunos protocolos, sus diferencias radican en los materiales utilizados, así como en algunos procedimientos. Inicialmente se propone anestésiar a los individuos que se requieren administrar, ya sea por inmersión en una solución de MS-222 (Luo et al., 2019), a una concentración de 0.16 mg/mL (Zang et al., 2011), de 0.1 a 0.12 mg/mL (Kalueff & Cachat, 2011) y 0.20 mg/mL en buffer Tris/HCl (Dorsemans et al., 2017), o por disminución gradual de temperatura de 17°C a 12°C en aproximadamente 5 min. (Zang et al., 2017). Todas las metodologías presentan resultados satisfactorios; posteriormente se reportan los volúmenes de administración que, en la mayoría de los protocolos se encuentran entre los 5 y 10 µL, así como el material utilizado para la administración como son las jeringas de insulina (Dorsemans et al., 2017) y jeringas Hamilton (Kalueff & Cachat, 2011; Zang et al., 2017), posteriormente se verifica la correcta absorción de analitos por esta vía.

Por las consideraciones anteriores, para la implementación de esta metodología se propone un protocolo de exposición aguda a glucosa (Dorsemans et al., 2017) estandarizando los materiales y la metodología necesaria.

3.4 Toma de muestra sanguínea

Es una metodología comúnmente utilizada para monitorear los efectos generados por la administración de xenobióticos en un organismo. Su uso en el pez cebrá se encuentra limitado y puede complicarse debido a su tamaño (Zang et al., 2013), la posibilidad de causar un daño significativo en el tejido y la obtención de cantidades pequeñas de muestra que limiten su procesamiento. Para tomar la muestra sanguínea satisfactoriamente se han implementado diversos protocolos los cuales presentan diferente probabilidad de causar un daño grave al organismo, siendo la mayoría de ellos letales (Zang et al., 2015).

Estos métodos incluyen la decapitación, la incisión lateral en la zona de la aorta dorsal, el corte de la aleta caudal, la extracción ocular y la punción cardiaca (Babaei et al., 2013; Capiotti et al., 2014; Dorsemans et al., 2017; Gleeson et al., 2007; Kulkarni et al., 2014; Zang et al., 2013, 2015).

Los primeros protocolos que emplearon peces cebra para determinación de glucosa recurrieron a la decapitación; para ello, el animal se anestesia con MS-222 [0.1 mg/dL] y posteriormente se retira la cabeza con un bisturí, la sangre se colecta directamente del corazón expuesto colocando la tira reactiva del glucómetro (Gleeson et al., 2007). Otra metodología empleada con frecuencia, recurre al corte de la aleta caudal, posteriormente la muestra se toma colocando la tira reactiva directo en la zona de corte (Capiotti et al., 2014) o bien con una pipeta heparinizada. Cabe destacar que el volumen obtenido de este proceso es muy pequeño, por lo tanto, existen modificaciones al protocolo, donde se coloca a los organismos con la aleta retirada en un microtubo de 0.5 mL perforado del fondo, este microtubo perforado se coloca dentro de un microtubo de 1.5 mL con heparina, posteriormente el organismo se somete a centrifugación y de esta manera se favorece la recolección de un volumen mayor de sangre del organismo. Esta metodología además permite obtener sangre no contaminada debido al procedimiento (daño en órganos internos que causara residuos de ellos en la sangre extraída) (Babaei et al., 2013). Por último, se han reportado protocolos de extracción ocular, para este procedimiento es necesario sacrificar a los animales por sobredosis con MS-222 para, posteriormente, extraer un ojo de la cavidad ocular con ayuda de fórceps de disección. La muestra de sangre se colecta en la cavidad ocular y se toma directamente con la tira reactiva para glucómetro (Dorsemans et al., 2017).

Las metodologías que se presentaron anteriormente son letales, por ello y considerando el principio de las tres R's, que implica la reducción del número de organismos utilizados por experimento, recientemente, se reportó una nueva técnica en la cual se cortan capilares de vidrio de 1.0 mm de diámetro externo, heparinizados, se anestesia a los organismos con 2-fenoxietanol y cuidadosamente se inserta el capilar en la zona de la aorta dorsal. La muestra sanguínea se coloca sobre la superficie de un papel Parafilm y por último se colecta con la tira reactiva para glucómetro (Zang et al., 2015), con esta metodología se pudieron tomar muestras múltiples, de 2 μ L diarios, cada dos días o semanalmente, o un volumen de hasta 5 μ L por muestra semanalmente (Zang et al., 2013). Mediante este patrón de muestreo se reduce significativamente la cantidad de organismos por experimento y la letalidad asociada al experimento.

Con base en la información bibliográfica revisada, para la implementación de este protocolo se propone la obtención de muestras sanguíneas de la aorta dorsal.

3.5 Selección de glucómetro

Se evaluó la precisión de tres glucómetros comerciales marcas Contour Plus®, Freestyle Xceed® y Freestyle Optium Neo®; para ello, se colocó a una población de 27 organismos en condiciones estrictas de ayuno de 72 h, pasado el tiempo, se dividió la población en tres grupos, uno por glucómetro, como se muestra en la **Figura 4**, y se realizó la toma de muestra sanguínea a cada uno de ellos. Los valores obtenidos fueron analizados y de esta forma se seleccionó el glucómetro más adecuado para su uso en las propuestas metodológicas descritas posteriormente; los resultados obtenidos se muestran en la sección 4.4.

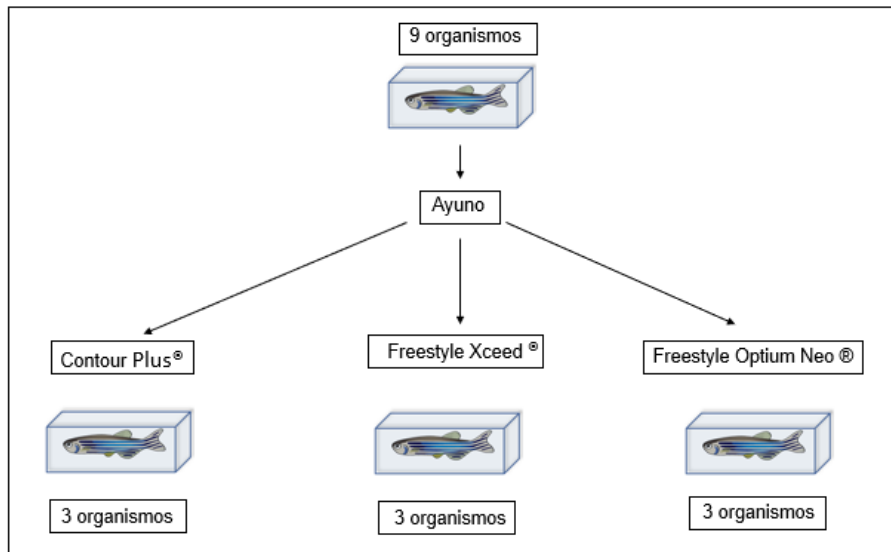


Figura 4. Selección de glucómetro. División de grupos por glucómetro y por tratamiento.

3.6 Curva de tolerancia a glucosa

Para determinar la concentración de glucosa a través del tiempo después de una carga del carbohidrato se preparó una solución de glucosa pesando 100 mg en balanza analítica que posteriormente se disolvieron con 500 μ L de agua para acuario esterilizada por radiación UV.

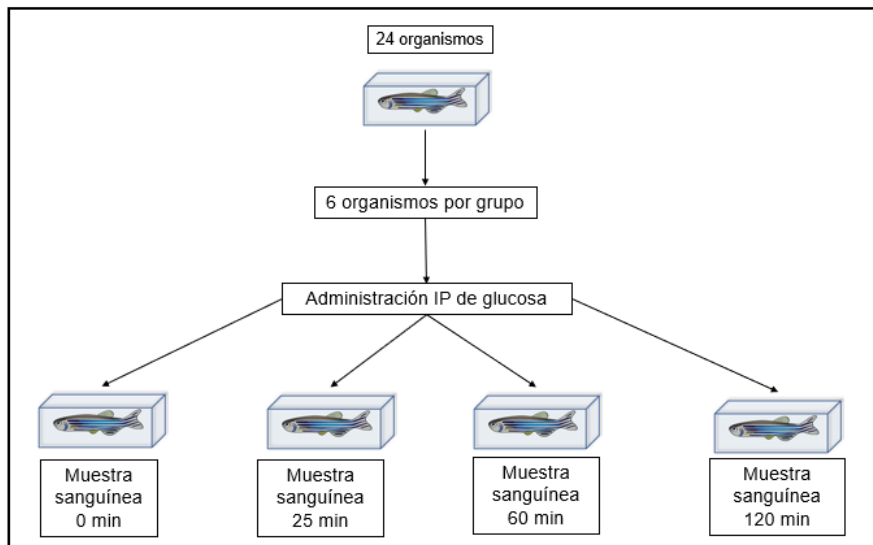


Figura 5. Diagrama general del procedimiento para realizar la curva de tolerancia a glucosa.

Para este experimento se utilizaron 24 organismos en condiciones estrictas de ayuno de 72 h, posteriormente la población se dividió en cuatro grupos de seis peces (**Figura 5**). A toda la población se le administró la solución de glucosa, preparada al momento, a una dosis de 1 mg/g por vía IP, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.5.3. Subsecuentemente, se tomó una muestra sanguínea a diferentes tiempos mediante la metodología mostrada en la sección 4.3. Al grupo uno (grupo control) se les tomó la muestra sanguínea a tiempo cero, al grupo dos a los 25 min., al grupo tres a los 60 min. y al grupo cuatro a los 120 min.

Al terminar el procedimiento se colocó a la población en una pecera limpia, con régimen habitual de alimentación y se dejó en reposo por un mes.

4 Resultados y Discusión

4.1 Modelo biológico: *Danio rerio*

4.1.1 Crecimiento y mantenimiento

La población experimental está alojada en el Instituto de Fisiología Celular, Laboratorio 214 Oriente, a cargo del Dr. Fernando López Casillas y bajo el cuidado del M.V.Z Gilberto Morales Villafaña. Los animales se encuentran contenidos en un Rack para peces cebra Zebrafish Stand Alone AH2030 de la marca Aquatic Habitats™, el cual consta de peceras de acrílico, todas conectadas a un sistema de purificación y recirculación de agua con la finalidad de mantener, bajo estricto control y monitoreo en tiempo real, las condiciones de limpieza, pH (6.8 a 7.5), conductividad, osmolaridad, oxígeno disuelto y temperatura (28.0°C). Los ciclos de luz-oscuridad se mantienen en 14 y 10 h, respectivamente. Para el óptimo

crecimiento de los peces se conservan hasta cinco ejemplares por litro de agua. La recirculación de agua y limpieza del tanque es constante para reemplazar la totalidad del volumen de un tanque semanalmente. Los sujetos de experimentación se alimentan dos veces al día (puede variar dependiendo del protocolo al que estén sometidos) con alimento comercial Tetracolor® y *Artemia salina* L. recién eclosionada.

El agua necesaria para los organismos se obtiene mediante un proceso de ultrapurificación con los equipos Elix™ y Milli Q™ con la posterior adición de sales Instant Ocean™. Todos estos cuidados se realizan de acuerdo a guías de Aquatic Habitats™ además de las recomendaciones de la plataforma ZFIN (Oregon University, 2022), para mantener las condiciones óptimas de desarrollo en un entorno de bajo estrés y en un ambiente controlado, asegurando un correcto control en su crecimiento, salud y garantizar la fidelidad de los resultados.

4.1.2 Características de la cepa obtenida

Para obtener la población experimental adecuada (**Figura 6**) se realizó la cruce entre las líneas silvestres TAB/WIK y AB/TU.

La cepa [TAB/WIK]/[AB/TU] presenta organismos libres de mutaciones en su fondo genético además de una muy alta similitud entre ellos, esto permite asumir que cada individuo de la población sea completamente igual al otro, al ser preservados bajo las mismas condiciones ambientales, garantizando que los valores de glucosa en sangre presenten un porcentaje de variación mínimo.

Para los procedimientos experimentales presentados en este protocolo se utilizaron peces de cuatro meses de edad de dos a dos centímetros y medio de largo y de 350 a 500 mg de peso aproximadamente, para garantizar el correcto manejo de los sujetos experimentales.



Figura 6. Pez cebra de la cepa [TAB/WIK]/[AB/TU] de cuatro meses de edad.

4.2 Anestesia

El método seleccionado para inducir anestesia en los animales de experimentación fue la crio-anestesia por inmersión en agua con hielo fragmentado, debido a que las características de este método aseguran una correcta inmovilización del pez, sin que esto implique su muerte y garantiza su total recuperación (Vargas-Vargas, 2017). Además, este método asegura el bienestar animal y la obtención de resultados con baja dispersión, al evitar la variación que se observa por la administración de agentes químicos en agua, que con frecuencia alteran de manera importante el pH, temperatura, salinidad, oxigenación y compuestos de nitrógeno disueltos (Martins et al., 2016), al igual que la anestesia con MS-222 que genera un aumento en los niveles de glucosa (Eames et al., 2010), afectando el bienestar de los organismos así como los resultados.

Para inducir el estado de anestesia en los organismos se colocaron tres peceras de acrílico, en la primera (1) se puso agua para acuario y se mantuvo a temperatura ambiente, en la segunda (2) se colocó agua para acuario y la cantidad necesaria de hielo fragmentado para mantenerla a una temperatura de entre 15 y 20 °C y en la tercera (3) se colocó agua para acuario y la cantidad necesaria de hielo fragmentado para mantenerla a una temperatura de entre 5 y 10 °C. Posteriormente, con ayuda de una red para peces, se colocó al organismo a anestesiarse en la pecera 1 por aproximadamente dos min., se trasladó al organismo a la pecera 2 y se mantuvo en ella el mismo tiempo que en la primera y por último, se transfirió a la pecera 3 hasta observar el efecto anestésico (un poco más de dos min.). En este estado, se extrajo al organismo listo para el procedimiento siguiente (**Figura 7**).

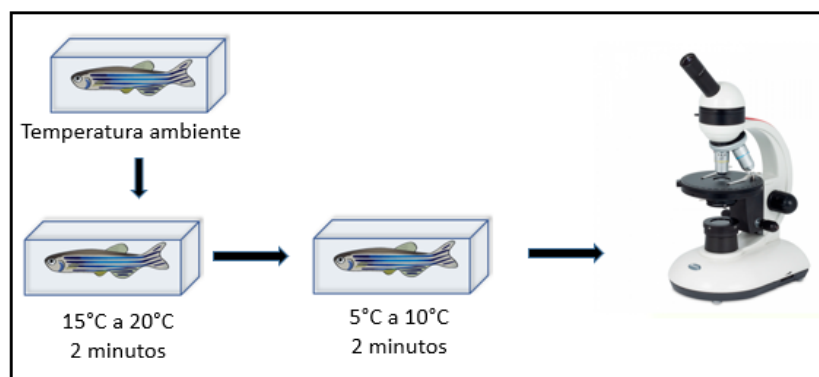


Figura 7. Resumen ilustrativo del procedimiento de anestesia.

En este procedimiento es importante distinguir las características del efecto anestésico generado por la crio-anestesia para evitar afectaciones importantes en el metabolismo y también que el proceso pueda volverse letal, para esto, se debe verificar el paso del organismo por tres estados:

- (I) Movimiento normal.
- (II) Movimientos corporales no coordinados y movimiento opercular.
- (III) Inmovilidad, pero movimiento opercular.

Estos estados suceden en el orden I, II, III al inducir la anestesia y III, II, I al vigilar su recuperación (Vargas-Vargas, 2017), ésta última se lleva a cabo rápidamente, por lo tanto, se cuenta con aproximadamente un minuto para realizar el procedimiento de interés en el pez cebra, antes de que inicie su periodo de recuperación (menos de 5 min.). Cabe destacar que este periodo se realiza con el organismo en agua de acuario a temperatura ambiente.

La anestesia generada por disminución gradual de temperatura permite la realización de procedimientos indoloros y de rápida recuperación, debido al corto tiempo de exposición de los organismos a bajas temperaturas, el metabolismo presenta poca afectación o disminución y se reestablece rápidamente (Zang et al., 2017). Por estas características la crio-anestesia es el método por elección para evaluar y monitorear los efectos farmacológicos o toxicológicos tras la administración de sustancias de prueba en peces cebra.

4.3 Toma de muestra sanguínea

Para realizar este procedimiento tomando como prioridad el bienestar de los organismos y debido a su tamaño, se optó por utilizar capilares de vidrio cortados; su uso se encuentra reportado en la bibliografía (Zang et al., 2013) ya que generan solo una pequeña incisión y un menor daño que jeringas de mayor calibre. Los capilares cuentan con diámetros externo de 1.0 mm e interno de 0.58 mm, el corte para generar la microjeringa se realizó en el equipo Micropipette Puller P-97 de Sutter Instruments con los siguientes parámetros: Heat 625; Pull 20; Vel 50; Time 200. Bajo este procedimiento se obtuvieron capilares con un diámetro interno menor a 0.29 mm en su extremo más angosto, posteriormente, con una pinza de disección para pez cebra y bajo el microscopio se eliminó la punta con la finalidad de abrir el capilar y generar un bisel (**Figura 8**).



Figura 8. Microscopía de la punta del capilar cortado (aguja), abierto y con el bisel del tamaño adecuado para realizar la punción.

Una vez obtenido el capilar, este se colocó en el dispositivo de toma de muestra que se observa en la **Figura 9**. Este dispositivo consta de una manguera plástica, dicha manguera se acopla por un extremo a un tapón perforado del centro donde se coloca el capilar y el otro extremo a una boquilla de plástico intercambiable.

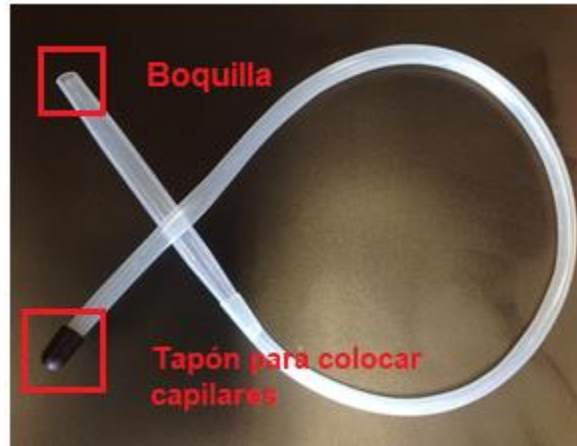


Figura 9. Dispositivo de toma de muestra.

El procedimiento para la toma de muestra consistió en colocar el capilar en el tapón perforado para agregar heparina y así evitar la coagulación de la muestra. A continuación, se anestesió al organismo mediante crio-anestesia. Terminado este procedimiento, se le colocó sobre una tapa de caja Petri de plástico cubierta con papel absorbente, en posición decúbito lateral y se eliminó el exceso de agua de la superficie de su cuerpo. Después, con ayuda de un microscopio se identificó la zona de punción (**Figura 10**). Esta zona se localiza debajo de la columna vertebral a la altura del ano y máximo un centímetro hacia la aleta caudal.



Figura 10. Zona de punción (recuadro rojo). Para facilitar la localización de esta zona se utilizó luz incidente inferior y se colocó al pez en posición decúbito lateral.

Una vez localizada la zona de punción, con ayuda del capilar, se retiraron cuidadosamente dos o tres escamas jalándolas hacia la aleta caudal. En la zona libre de escamas se ingresó el capilar cuidadosamente a poco menos de 90° con referente a la posición del organismo, hasta llegar a la aorta dorsal. Se conoce que se llegó a este vaso sanguíneo cuando en el capilar se observa la afluencia de sangre rápida y constante (**Figura 11**). Para obtener la muestra de sangre adecuada para una tira reactiva se absorbe ligeramente con la boquilla hasta obtener el volumen necesario. Después, el capilar se retira cuidadosamente manteniendo el ángulo de punción. Finalmente, el organismo se coloca en agua de acuario a temperatura ambiente para su fase de recuperación.



Figura 11. Ingreso correcto del capilar. Se incidió en la zona de punción, al entrar en contacto con la aorta dorsal se comenzó a ver un llenado de sangre constante.

Para la medición de las concentraciones de glucosa en sangre las muestras se colocaron sobre papel Parafilm y posteriormente se colectaron con una tira reactiva. Los niveles del carbohidrato se determinaron con ayuda de un glucómetro comercial, los resultados obtenidos se muestran en los puntos 4.4 y 4.6.

Cuando no se punciona correctamente se corre el riesgo de herir la espina dorsal debido a que el vaso sanguíneo se encuentra ventral a esta, al lastimar al organismo en esta zona se le impide el correcto movimiento y flotación, por ello, es de gran importancia conocer previamente la anatomía de la especie, además de asesorarse con especialistas. A pesar de esta dificultad, la tasa de mortalidad posterior a este procedimiento fue muy baja, siendo la mejor opción para toma de muestra frente a otras metodologías como la decapitación, corte la aleta dorsal y extracción ocular, entre otras.

Debido a que el procedimiento es poco invasivo, se ha reportado su uso para más de una toma de muestra por organismo, donde se observó que el volumen máximo de muestra es directamente proporcional a su peso, y también presenta una baja tasa de mortalidad (Zang et al., 2015), con esta información, se realizó un procedimiento de toma de muestra múltiple para generar curvas de tolerancia a glucosa (los resultados no se muestran). Los datos obtenidos mostraron una variación muy alta, posiblemente debido a diferentes factores como el estrés, la dilución de la muestra, mayor dificultad para poder obtenerla y su posible contaminación con componentes presentes en la recuperación y cicatrización de las heridas generadas por el capilar. Considerando la alteración de resultados por estos factores, se permitió la recuperación de mínimo un mes de los organismos de estudio antes de volver a realizar alguna punción en la aorta para evitar daños en su salud y también obtener resultados de baja variabilidad.

4.4 Selección de glucómetro

Todo instrumento de medición tiene un importante porcentaje de variación, para el correcto control de la DMT2, así como la prevención de sus complicaciones, se debe de contar con un glucómetro con bajo porcentaje de diferencia relativa de la media absoluta o MARD, por sus siglas en inglés. Para realizar esta selección se tomaron en cuenta los glucómetros que presentaron esta característica en estudios previos (Ekhlaspour et al., 2017) así como la disponibilidad de equipos para el presente estudio. Los equipos seleccionados fueron los siguientes: Contour Plus®, Freestyle Xceed® y Freestyle Optium Neo®.

Como se mencionó en la metodología, para cada glucómetro se analizaron los valores de glucosa obtenidos después de un periodo de ayuno de 72 h. Las muestras se analizaron con los glucómetros asignados. Con el Contour Plus® se obtuvo un promedio de [29.4 mg/dL], SD de 0.58% y CV de 1.96%, con el Freestyle Xceed® se registró un promedio de [42.0 mg/dL], SD de 8.0% y CV de 19.04%, por último, con el Freestyle Optium Neo® se calculó un promedio de [47.0 mg/dL], SD del 13.0% y CV de 27.6% (**Figura 12**). Por el tratamiento que se realizó en esta metodología, se esperaba obtener bajos valores de glucosa debido a que se ha reportado que a partir de las 72 h de ayuno la concentración disminuye considerablemente generando una línea base. Se han referido valores menores a [40 mg/dL] (Eames et al., 2010). Partiendo de este valor, el glucómetro Contour Plus® es el único que presentó valores menores al reportado para este tiempo de ayuno, los otros dos glucómetros no presentan valores muy altos, pero si mayores al referido, además de que la desviación estándar y coeficiente de variación es considerablemente menor en el primer equipo en comparación con los otros dos, por ello, se seleccionó este glucómetro para la cuantificación de glucosa en experimentos posteriores, ya que presentó mayor exactitud y precisión.

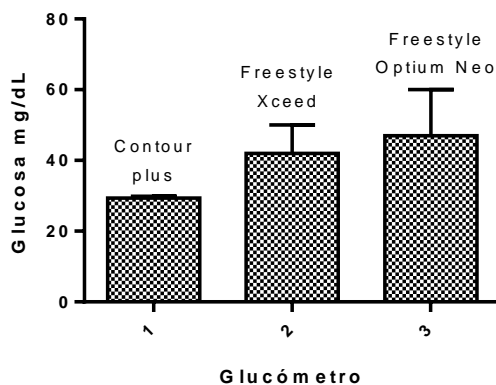


Figura 12. Selección de glucómetro. Gráfico obtenido de tomas de muestra sanguínea con los glucómetros marca (1) Contour Plus®, (2) Freestyle Xceed® y (3) Freestyle Optium Neo®.

4.5 Vías de administración

4.5.1 Inmersión o absorción por mucosas

Como se mencionó en el apartado 3.3.1 de la sección de metodología, existen diferentes protocolos de inmersión que han presentado resultados satisfactorios generando hiperglucemia en peces cebras, sin embargo, existe una gran variabilidad entre ellos, por ejemplo, en parámetros como la concentración de glucosa, el periodo de inmersión, la cantidad de organismos por experimento, la edad de los peces, los protocolos de alimentación, entre otros. Además de la ausencia de información detallada para poder replicar los experimentos presentados. Por ello, en este trabajo se estableció un protocolo de inmersión para peces cebras jóvenes en soluciones de glucosa, los detalles de esta metodología se describen a continuación.

Se tomó a una población de 18 organismos de mínimo cuatro meses de edad, la selección del tamaño de la población experimental se realizó tomando en cuenta los peces que presentaron el mayor tamaño y peso para su edad, de esta manera se facilitó su manejo para la obtención de muestras sanguíneas y, además, se buscó disminuir la mortalidad inherente al tratamiento. Todos los organismos se mantuvieron en ayuno estricto por 72 h, para ello, se realizaron cambios de agua o soluciones de glucosa de cada pecera, además del lavado de todos los aditamentos contenidos dentro de ella, de esta forma se eliminaron las heces generadas por los peces por día, y también toda biopelícula generada en las superficies y que pudieran servir como fuente de nutrientes. El periodo de 72 h se seleccionó debido a que es el tiempo mínimo necesario para mantener niveles de glucosa bajos y constantes, mientras que a las 48 h se presenta un incremento de glucosa importante con un CV (coeficiente de variación) =27% (Eames et al., 2010).

Pasado el tiempo de ayuno, se dividió la población en tres grupos de seis individuos cada uno y se colocaron en vasos de precipitados de vidrio de 250 mL con aproximadamente 150 mL de agua para acuario o solución de glucosa según corresponda; al grupo uno o grupo control, se le colocó en agua de acuario, los grupos dos y tres se colocaron en una solución de glucosa con una concentración de 1.5%, para el grupo dos por un periodo de tres días y para el grupo tres por un periodo de cinco días. Terminado el tiempo de exposición, los organismos se transfirieron a vasos limpios con agua de acuario por 30 min. para eliminar fuentes de interferencia del medio al momento de tomar la muestra sanguínea. Los resultados obtenidos y su variación se muestran en la **Figura 13**.

La concentración de glucosa se seleccionó tomando en cuenta la edad de los organismos así como su fácil adaptación a cambios en el medio (Connaughton et al., 2016), por ello, se realizó un protocolo de exposición aguda a una alta concentración de glucosa por cortos periodos de tiempo, de esta forma, aunque la concentración es alta, la mortalidad es baja. Como se observa en la **Figura 13**, el valor obtenido en el grupo control, posterior al ayuno de 72 h tiene una diferencia significativa con los valores de glucosa obtenidos para tratamientos a los tres y cinco días, cumpliendo con el objetivo del experimento y, además, con un porcentaje de mortalidad del cero por ciento. Por otro lado, no se observó una diferencia significativa en la glucosa entre los tres y cinco días de exposición, de esta manera se estableció el tiempo de exposición de tres días para el protocolo bajo las condiciones especificadas anteriormente. Cabe destacar que los valores de glucosa obtenidos de aproximadamente [100 mg/dL], posteriores a un periodo de ayuno estricto de 72 h, son muy cercanos al valor reportado como uno de los criterios para el diagnóstico de DMT2 al realizar un análisis después de un ayuno de por lo menos 8 h (Internation Diabetes Federation, 2019).

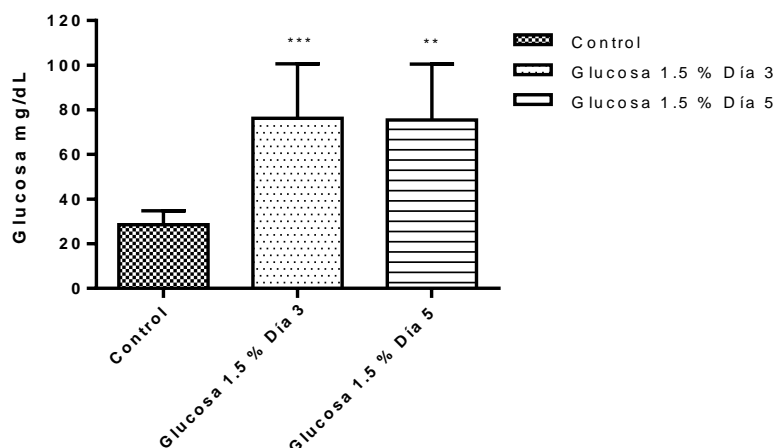


Figura 13. Concentraciones obtenidas de glucosa en sangre posterior al tratamiento con 1.5% de glucosa por tres y cinco días.

4.5.2 Administración oral

La administración por vía oral es ampliamente utilizada en la experimentación con modelos biológicos. Específicamente con peces cebras, se vuelve un gran desafío debido al tamaño de los organismos, a sus requerimientos de respiración (respiración branquial) y a los requisitos específicos para administrar por esta vía. Como se discutió anteriormente, una de las metodologías más utilizadas consiste en administrar soluciones directamente en el TGI con una punta de micropipeta de volumen bajo (Banote et al., 2013; Kulkarni et al., 2014; Zang et al., 2017) mientras el organismo está bajo anestesia. Para evaluar la eficacia de esta metodología, se realizaron dos réplicas de este experimento, en la primera se utilizó crio-anestesia y se administró una solución colorida de glucosa, posteriormente, se midieron los niveles de glucosa en sangre, sin embargo, los valores presentaron CV muy alto, debido principalmente a la pérdida de la solución colorida a través de los opérculos al momento de colocar los organismos en agua de acuario a temperatura ambiente para su recuperación. La pérdida del material administrado aumentó con el inicio de las fases de recuperación, es decir, a mayor movimiento opercular mayor pérdida de solución expulsada, indicando una administración incorrecta. En un segundo experimento, se repitió el procedimiento anterior eliminando el uso de anestesia para administrar rápidamente y de forma más profunda sosteniendo cuidadosa y ligeramente los opérculos para evitar la salida de la solución, al momento de regresar al organismo al agua se observaron menos casos de administración incorrecta, pero la variación de las concentraciones de glucosa en sangre se mantuvo alta.

Considerando la elevada variación registrada empleando las estrategias anteriores, se replicó la metodología reportada por Zang et al., 2011, generando gránulos para consumo directo por los peces, evitando posibles lesiones causadas por el proceso de administración. Para implementar esta metodología se obtuvo el peso seco de los organismos y con estos valores se calculó el peso de cristales de sacarosa necesarios para administrar una dosis de 1 mg/g de pez. Posteriormente, se trituró un poco de alimento comercial Tetracolor®, se colocó sobre un portaobjetos limpio y con ayuda de una pipeta automática se le adicionaron varias gotas de agua de 1 µL hasta que se generó una pasta, a continuación, con ayuda de dos pinzas de disección para pez cebras y un microscopio Olympus™ modelo SZX2- ILLT, se recubrió cada uno de los cristales pesados correspondientes a cada organismo y se dejaron secar bajo la luz del microscopio por solo un minuto para evitar que la sacarosa se fundiera por acción de la temperatura, terminado este tiempo se retiraron de la luz y se mantuvieron expuestos los gránulos al ambiente hasta que se secaron por completo. Cada uno debe medir menos que la distancia que existe entre los ojos del organismo para que pueda ser consumido con éxito.

Para realizar esta administración se mantuvo a los organismos en ayuno estricto de 72 h y 30 o 60 min. previos a la administración, se separaron en peceras individuales teniendo cuidado de mantenerlos en un ambiente libre de factores estresantes.

Subsecuentemente, se colocaron los gránulos de sacarosa en la pecera correspondiente, observando que los peces los consumieran de una sola intención (Figura 14) y en máximo 5 minutos.

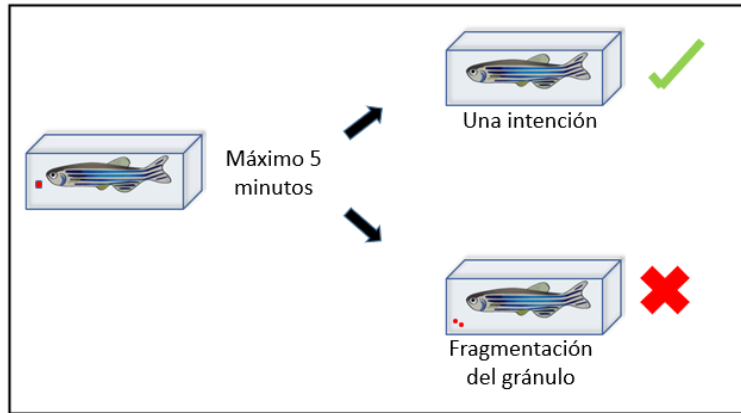


Figura 14. Ilustración de la metodología de administración oral mediante un gránulo recubierto con alimento comercial. El gránulo debe de ser consumido en una sola intención.

En el momento en que los organismos consumieron su gránulo se tomó la hora como tiempo cero para poder tomar las muestras sanguíneas posteriores y así determinar la concentración de glucosa como resultado del metabolismo de la sacarosa. En la mayoría de los casos se observó un incremento en las concentraciones de glucosa sanguínea. Tomando en consideración los resultados obtenidos de este experimento se estableció el protocolo de administración por vía oral.

4.5.3 Administración intraperitoneal (IP)

El paso inicial para realizar la administración IP es la selección de la jeringa o aguja adecuada para ello, en la literatura se reporta el uso de diferentes jeringas de insulina (Chaudhari et al., 2013; Dorsemans et al., 2017; Samaee et al., 2017; Zang et al., 2017) y jeringas Hamilton (Kalueff & Cachat, 2011), al igual que en el punto 4.3, se optó por utilizar capilares de vidrio cortados con diámetros externo de 1.0 mm e interno de 0.58 mm, donde, posterior al proceso de corte se obtiene un capilar con diámetro interno menor a 0.29 mm en su extremo más angosto. Después, la aguja preparada se acopló en un dispositivo implementado para tomar y dispensar la solución a administrar. Este dispositivo consta de una jeringa de insulina, sin

aguja, acoplada herméticamente a una manguera plástica (**Figura 15**) y ésta a su vez, acoplada al capilar en el extremo libre.

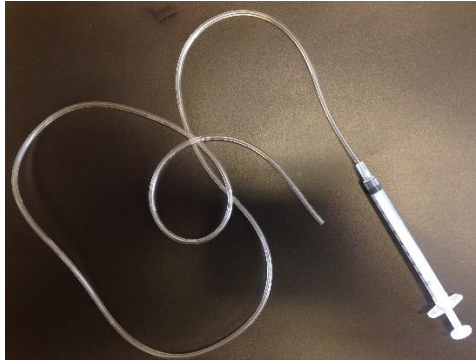


Figura 15. Dispositivo de carga y descarga de la solución.

Una vez montado el dispositivo de carga, se tomó el volumen de solución de glucosa a administrar ($1\mu\text{L}$ por cada 200 mg de peso) con micropipeta y se colocó en la tapa de un microtubo, de ahí, se tomó el volumen con el capilar, cuidando no romper ni maltratar la punta del capilar y tomando el volumen lentamente (**Figura 16**).



Figura 16. Proceso de carga de muestra. Para obtener la muestra se dejó un volumen de aire en la jeringa, posteriormente se acercó la punta del capilar a la gota de solución y se fue jalando el émbolo de la jeringa muy lentamente hasta que el volumen de la gota se cargó por completo y de manera uniforme. Para verificar que no hay residuos de solución en la tapa se utilizó la luz del microscopio.

Una vez anestesiado el organismo de experimentación, se retiró del agua y rápidamente se secó con papel absorbente y, con ayuda de un sujetador, se colocó en posición decúbito dorsal bajo la luz del microscopio para identificar la zona de

punción (**Figura 17**). Este sitio se localiza en el vientre inferior y presenta un color blanco aperlado característico, se encuentra ligeramente debajo de las aletas ventrales y antes del ano (**Figura 18**). El capilar se ingresó, aproximadamente a 20° de inclinación con respecto al organismo, hasta llegar al peritoneo (Dorsemans et al., 2017) que se observa como una membrana plateada, y posteriormente, se comenzó a dispensar la solución lentamente hasta vaciar el capilar en su totalidad, evitando el ingreso de aire. Las primeras administraciones fueron realizadas con soluciones coloridas para verificar que, efectivamente la solución ingresara en el peritoneo. Desde el momento en que el organismo está bajo anestesia se cuenta con un minuto, como máximo, para realizar la administración antes de que la fase de recuperación dé inicio.

Esta metodología se implementó para la administración de soluciones de glucosa, con la finalidad de generar hiperglucemia en el pez cebra. Bajo estas condiciones el modelo es útil para evaluar moléculas que disminuyan la concentración de glucosa en sangre. Para comprobar la correcta absorción de la glucosa se realizó una toma de muestra sanguínea y se analizó con un glucómetro, los resultados obtenidos se muestran en el punto 4.6, donde, se observa un aumento en los niveles de glucosa indicando una correcta administración y absorción de la solución administrada.

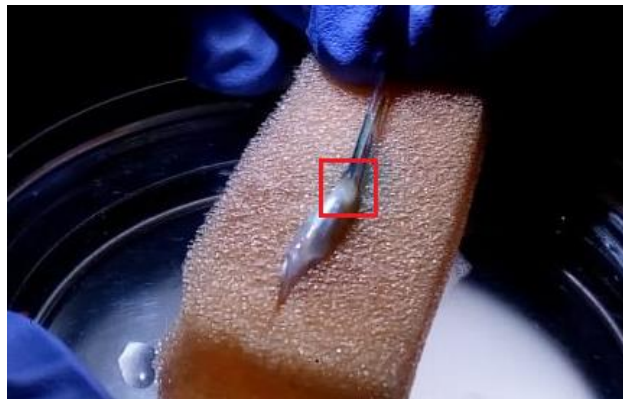


Figura 17. Ubicación de la zona de punción para la vía de administración intraperitoneal en el recuadro rojo.

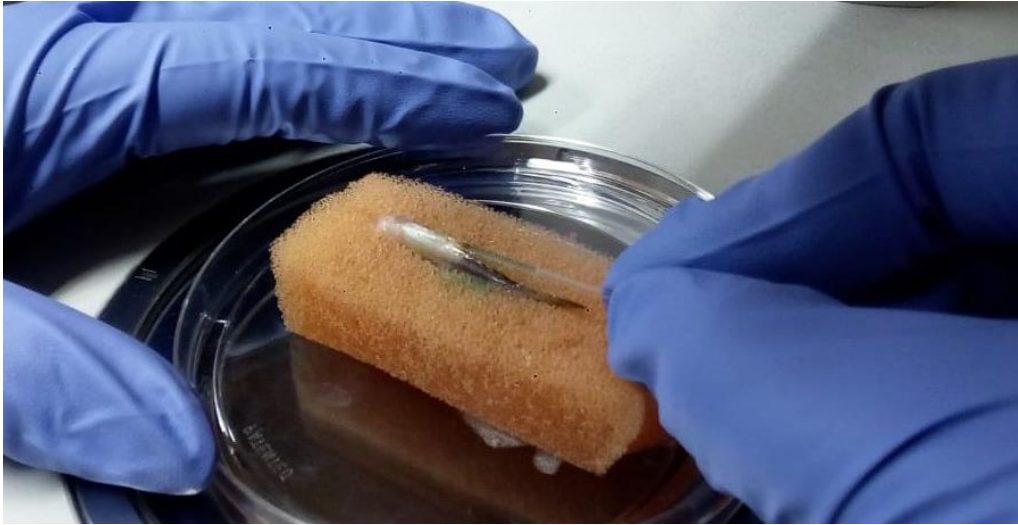


Figura 18. Administración intraperitoneal. Se colocó al organismo anestesiado en un sujetador, en posición decúbito dorsal, se ubicó la zona de punción y por ahí se ingresó el capilar, ya cargado, hasta llegar al peritoneo, para mejor visibilidad se utilizó luz incidente superior.

4.6 Curva de tolerancia a glucosa (CTG)

Utilizando las metodologías de crio-anestesia, administración IP y toma de muestra sanguínea, descritas anteriormente, se realizó una propuesta de protocolo para la evaluación del metabolismo de la glucosa en el pez cebra mediante la generación de CTG. Para ello, una población de 24 peces se mantuvo en ayuno estricto por 72 h y posteriormente se les administró una solución de glucosa a una dosis de 1 mg/g de pez. Las muestras de sangre se analizaron con el glucómetro Contour Plus® (Figura 19).

La CTG evalúa la capacidad de un organismo de regresar a la homeostasis posterior a la administración de una dosis alta de glucosa. Para realizar esta evaluación se analizaron inicialmente las muestras de sangre del grupo a tiempo cero, de igual manera que en el punto 4.4, se obtuvieron valores menores a [40 mg/dL], específicamente se obtuvo una concentración de [37.5 mg/dL] como punto de inicio de la curva, a continuación, para el grupo de 25 min se evaluó la concentración de glucosa en sangre donde se obtuvo un importante incremento hasta [320.3 mg/dL], este valor corresponde al pico postprandial de la CTG, dicho pico, se ha reportado a los 30 min posteriores a la administración IP de esta solución (Eames et al., 2010; Zang et al., 2017), para corroborar el tiempo en el que se presenta este punto, se realizó un estrecho monitoreo de las concentraciones de glucosa entre los 20 y 40 min (los resultados no se muestran), donde se observó el incremento de glucosa entre los 20 y 24 min, llegando a su máximo valor a los 25 min y, a partir de ahí, una moderada y paulatina disminución de este parámetro, de esta forma se determinó

la presencia del pico postprandial a los 25 min. y se estableció este tiempo para la toma de muestra sanguínea en el protocolo experimental.

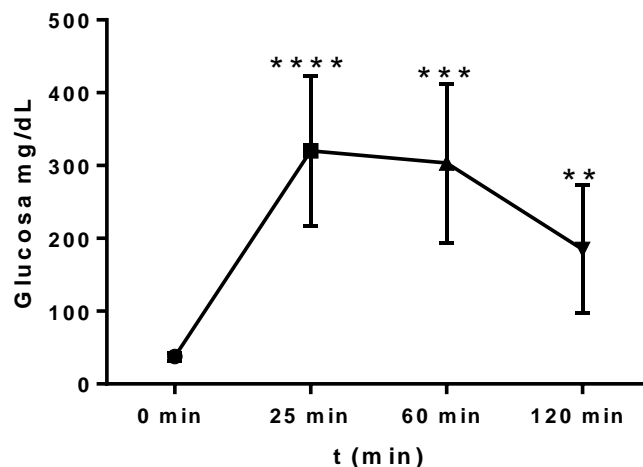


Figura 19. Curva de tolerancia a glucosa. Muestras obtenidas a los cero, 25, 60 y 120 min. Se realizó la prueba *t* no pareada: (1) 0 min vs 25 min donde se obtuvo [37.5 ± 2.3 mg/dL] y [320.2 ± 41.9 mg/dL] respectivamente, $P < 0.0001$ ****. (2) 0 min vs 60 min donde se obtuvo [37.5 ± 2.3 mg/dL] y [303.5 ± 44.7 mg/dL] respectivamente, $P < 0.0001$ ***. (3) 0 min vs 120 min donde se obtuvo [37.5 ± 2.3 y 184.8 ± 35.8 mg/dL] respectivamente, $P < 0.0021$ **.

A continuación, se realizó el análisis de glucosa en sangre a los 60 y 120 min. de la administración, donde se observó un valor correspondiente a [303.5 mg/dL] y [184.8 mg/dL] respectivamente, para ambos casos, se observa una disminución constante de la concentración, indicando la recuperación de la homeostasis en el organismo, posterior a la carga alta de glucosa. Idealmente, el último valor obtenido en la curva debe de encontrarse muy cercano al basal para estos organismos con un régimen habitual de alimentación, de esta manera se evalúa el correcto metabolismo del carbohidrato y, por consiguiente, la salud del organismo administrado.

Además de la tendencia observada, se realizó un análisis estadístico mediante el programa GraphPad Prism, donde se requiere evaluar la diferencia existente entre los datos obtenidos, con esta finalidad, se realizó una prueba *t* no pareada entre el grupo 0 min con los grupos 25 min, 60 min y 120 min, de esta manera se compararon las medias poblacionales de cada grupo, el primer análisis realizado corresponde a 0 min vs 25 min, donde, la concentración de glucosa corresponde a [37.5 ± 2.3 mg/dL] y [320.2 ± 41.9 mg/dL] respectivamente, se obtuvo un valor de $P < 0.0001$ indicando una diferencia significativa entre estos grupos ****. La comparación correspondiente a 0 min vs 60 min donde se obtuvieron concentraciones de [37.5 ± 2.3 mg/dL] y [303.5 ± 44.7 mg/dL] respectivamente, se obtuvo un valor de $P < 0.0001$

indicando también una diferencia significativa entre estos grupos, pero menor a la presentada en el análisis anterior ***. Por último, los resultados obtenidos en el análisis 0 min vs 120 min, con concentraciones de $[37.5 \pm 2.3$ y 184.8 ± 35.8 mg/dL] respectivamente se obtuvo un valor de $P < 0.0021$ y, de igual manera, se obtiene una diferencia significativa entre los grupos, pero menor que la presentada en el análisis previo **. Todas las diferencias significativas se encuentran señaladas en la **Figura 19**.

Con los resultados obtenidos del análisis estadístico se observa que la especie *Danio rerio* es un modelo adecuado para la valoración del potencial hipoglucemiante de moléculas de prueba empleando curvas de tolerancia a la glucosa. Además, con el protocolo establecido el valor inicial de glucosa en sangre es adecuado y permite observar un incremento importante en la siguiente muestra analizada (25 min). Posteriormente se observa una tendencia de disminución, que inicialmente no es significativa (glucosa a los 25 min vs 60 min, valor de $P = 0.7911$), sugiriendo que el tiempo de muestreo de 60 min no es requerido para la obtención de la tendencia de la curva, por ello, se propuso la realización de otra CTG eliminando dicho punto y colocando uno intermedio para observar una mayor disminución de la concentración de la glucosa en sangre posterior al pico postprandial. El experimento se realizó manteniendo la misma cantidad de organismos de la población (ocho por grupo).

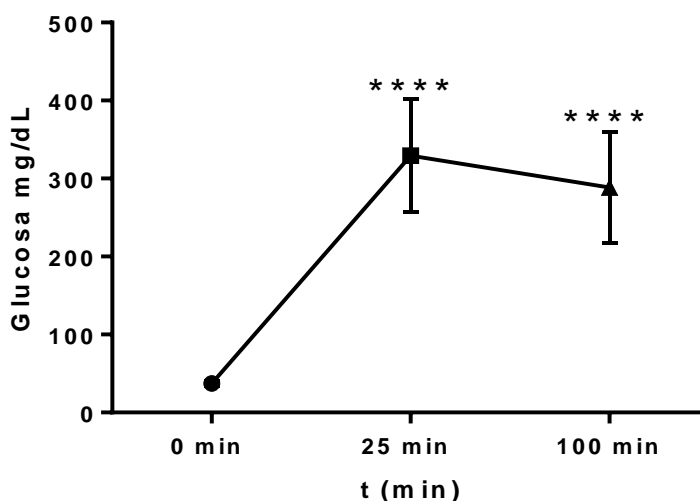


Figura 20. Curva de tolerancia a glucosa. Muestras obtenidas a tiempo cero, 25 y 100 min. Se realizó la prueba t no pareada: (1) 0 min vs 25 min donde se obtiene $[37.3 \pm 1.3$ mg/dL] y $[329.5 \pm 25.7$ mg/dL] respectivamente, $P < 0.0001^{****}$. (2) 0 min vs 100 min donde se obtuvo $[37.3 \pm 1.3$ mg/dL] y $[288.4 \pm 25.3$ mg/dL] respectivamente, $P < 0.0001^{****}$. (3) 25 min vs 100 min donde se obtuvo $[329.5 \pm 25.7$ mg/dL] y $[288.4 \pm 25.33$ mg/dL] $P=0.2735$.

Como se observa en la **Figura 20**, la tendencia obtenida es similar a la CTG anterior, en este caso, se realizó toma de muestra a los cero, 25 y 100 min. y al igual que en la curva anterior se realizó el análisis estadístico mediante la prueba *t* no pareada entre el grupo cero min y los otros dos grupos. El primer análisis, realiza la comparación entre la concentración de $[37.3 \pm 1.3 \text{ mg/dL}]$ y $[329.5 \pm 25.7 \text{ mg/dL}]$ donde se obtuvo un valor de $P < 0.0001$ indicando la presencia del pico postprandial de la curva y una evidente diferencia significativa entre ellos****; posteriormente, el segundo análisis entre las concentraciones de $[37.3 \pm 1.3 \text{ mg/dL}]$ y $[288.4 \pm 25.3 \text{ mg/dL}]$ se obtuvo un valor de $P < 0.0001$ indicando una diferencia significativa**** entre los grupos y una disminución de la glucosa baja para este tiempo; el análisis entre $[329.5 \pm 25.7 \text{ mg/dL}]$ y $[288.4 \pm 25.33 \text{ mg/dL}]$ no denotó una diferencia significativa al igual que en la curva anterior pero se obtuvo una disminución del valor de P a 0.2735 mientras que el correspondiente a la CTG anterior fue de 0.7911, de esta manera se pudieron establecer los tiempos de toma de muestra en cero, 25 y 100 min. para la realización de una CTG adecuada.

5. Conclusiones

- Como se observó en el presente trabajo, las condiciones de crecimiento y mantenimiento del pez cebra juegan un papel muy importante para su uso como modelos biológicos de laboratorio, a pesar de que estos organismos son una especie comercial y parecería que su mantenimiento es sencillo, se presentan diversas dificultades ambientales que deben ser monitoreadas estrechamente para evitar alteraciones durante algún protocolo experimental, para esto, se observó que todos los equipos y materiales utilizados para la contención, alimentación y limpieza del agua son los adecuados para eliminar factores estresantes que afecten directamente el organismo e indirectamente los resultados de protocolos experimentales realizados en ellos.
- Las características presentadas por la cepa [TAB/WIK]/[AB/TU] fueron las ideales para su uso en las propuestas de metodologías descritas, permitiendo su fácil manejo, adecuada recuperación y bajo índice de mortalidad en todos los experimentos, además de una baja variación en los datos obtenidos.
- La crio-anestesia mostró ser la metodología más adecuada para la realización de administraciones intraperitoneales y toma de muestra sanguínea, gracias a su poca afectación en el metabolismo además de que, al realizarse bajo los parámetros adecuados, se obtuvo una baja mortalidad, conservando de esta manera los criterios de las tres R's.
- La inmersión, administración oral, administración intraperitoneal y toma de muestra sanguínea se estandarizaron satisfactoriamente y, con ello, se realizó el protocolo interno de trabajo para el grupo de investigación del Dr. José Alberto Rivera Chávez.
- Mediante la exposición de los organismos por inmersión en glucosa al 1.5% se obtuvo un estado transitorio de hiperglucemia, por otro lado, con una dosis de 1 mg/g del mismo carbohidrato administrado por vía intraperitoneal, se obtuvo el mismo estado transitorio, además de la CTG. La generación del modelo hiperglucémico *in vivo* por cualquiera de estas dos vías permitirá la evaluación de moléculas inhibitoras de la proteína PTP1B como posibles fármacos para el tratamiento de la DMT2.

6. Referencias

- Babaei, F., Ramalingam, R., Tavendale, A., Liang, Y., Yan, L. S. K., Ajuh, P., Cheng, S. H., & Lam, Y. W. (2013). Novel blood collection method allows plasma proteome analysis from single zebrafish. *Journal of Proteome Research*, 12(4), 1580–1590. <https://doi.org/10.1021/pr3009226>
- Banote, R. K., Koutarapu, S., Chennubhotla, K. S., Chatti, K., & Kulkarni, P. (2013). Oral gabapentin suppresses pentylenetetrazole-induced seizure-like behavior and cephalic field potential in adult zebrafish. *Epilepsy & Behavior : E&B*, 27(1), 212–219. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2013.01.018>
- Barraza-Illoréns, M. (2016). *Carga Económica de la Diabetes Mellitus en México , 2013* (Issue July).
- Bauzá Tamayo, G., Bauzá Tamayo, D., Bauzá López, J. G., Vázquez Gutierrez, G. L., De la Rosa Santana, J., Daniel, & García Díaz, Y. (2022). Incidencia y factores de riesgo de la diabetes gestacional. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 16(1), 79–90.
- Capiotti, K. M., Antonioli, R., Kist, L. W., Bogo, M. R., Bonan, C. D., & Da Silva, R. S. (2014). Persistent impaired glucose metabolism in a zebrafish hyperglycemia model. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology*, 171(1), 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.03.005>
- Chaudhari, G. H., Chennubhotla, K. S., Chatti, K., & Kulkarni, P. (2013). Optimization of the adult zebrafish ECG method for assessment of drug-induced QTc prolongation. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 67(2), 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2013.01.007>
- Collymore, C., Rasmussen, S., & Tolwani, R. J. (2013). Gavaging adult zebrafish. *Journal of Visualized Experiments*, 78, 1–4. <https://doi.org/10.3791/50691>
- Connaughton, V. P., Baker, C., Fonde, L., Gerardi, E., & Slack, C. (2016). Alternate Immersion in an External Glucose Solution Differentially Affects Blood Sugar Values in Older Versus Younger Zebrafish Adults. *Zebrafish*, 13(2), 87–94. <https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1155>
- de Souza Anselmo, C., Sardela, V. F., de Sousa, V. P., & Pereira, H. M. G. (2018). Zebrafish (*Danio rerio*): A valuable tool for predicting the metabolism of xenobiotics in humans? *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 212(May), 34–46. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.06.005>
- Dorsemans, A. C., Lefebvre d'hellencourt, C., Ait-Arsa, I., Jestin, E., Meilhac, O., & Diotel, N. (2017). Acute and chronic models of hyperglycemia in zebrafish: A method to assess the impact of hyperglycemia on neurogenesis and the biodistribution of radiolabeled molecules. *Journal of Visualized Experiments*, 2017(124), 4–11. <https://doi.org/10.3791/55203>
- Eames, S. C., Philipson, L. H., Prince, V. E., & Kinkel, M. D. (2010). Blood sugar

- measurement in zebrafish reveals dynamics of glucose homeostasis. *Zebrafish*, 7(2), 205–213. <https://doi.org/10.1089/zeb.2009.0640>
- Ekhlaspour, L., Mondesir, D., Lautsch, N., Balliro, C., Hillard, M., Magyar, K., Radocchia, L. G., Esmaeili, A., Sinha, M., & Russell, S. J. (2017). Comparative Accuracy of 17 Point-of-Care Glucose Meters. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 11(3), 558–566. <https://doi.org/10.1177/1932296816672237>
- Federación Mexicana de Diabetes. (2022). *Federación Mexicana de Diabetes, A.C.* <https://fmdiabetes.org/estadisticas-en-mexico/>
- Gleeson, M., Connaughton, V., & Arneson, L. S. (2007). Induction of hyperglycaemia in zebrafish (*Danio rerio*) leads to morphological changes in the retina. *Acta Diabetologica*, 44(3), 157–163. <https://doi.org/10.1007/s00592-007-0257-3>
- Gut, P., Reischauer, S., Stainier, D. Y. R., & Arnaout, R. (2017). Little fish, big data: Zebrafish as a model for cardiovascular and metabolic disease. *Physiological Reviews*, 97(3), 889–938. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2016>
- Hajar, R. (2011). Animal testing and medicine. *Heart Views*, 12(1), 42. <https://doi.org/10.4103/1995-705x.81548>
- Heckler, K., & Kroll, J. (2017). Zebrafish as a model for the study of microvascular complications of diabetes and their mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9), 1–10. <https://doi.org/10.3390/ijms18092002>
- International Diabetes Federation. (2019). Atlas de la Diabetes de la FID 2019. In *Atlas de la Diabetes de la FID*.
- International Diabetes Federation. (2021). IDF Diabetes Atlas. In E. J. Boyko, D. J. Magliano, S. Karuranga, L. Piemonte, P. Riley, P. Saeedi, & H. Sun (Eds.), *Diabetes Research and Clinical Practice* (10th ed., Vol. 102, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2013.10.013>
- Kalueff, A. V., & Cachat, J. M. (2011). Neuromethods: Preface. *Neuromethods*, 51, 169–179. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-953-6>
- Katzung, B. G., Masters, S. B., & Trevor, A. J. (2012). *Basic & Clinical Pharmacology* (B. G. Katzung, S. B. Masters, & A. J. Trevor (eds.); 12th ed.). Mc Graw Hill Medical. [https://doi.org/10.1016/S0065-7743\(08\)61545-6](https://doi.org/10.1016/S0065-7743(08)61545-6)
- Kulkarni, P., Chaudhari, G. H., Sripuram, V., Banote, R. K., Kirla, K. T., Sultana, R., Rao, P., Oruganti, S., & Chatti, K. (2014). Oral dosing in adult zebrafish: Proof-of-concept using pharmacokinetics and pharmacological evaluation of carbamazepine. *Pharmacological Reports*, 66(1), 179–183. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2013.06.012>
- Luo, Z. W., Wang, H. T., Wang, N., Sheng, W. W., Jin, M., Lu, Y., Bai, Y. J., Zou, S. Q., Pang, Y. L., Xu, H., & Zhang, X. (2019). Establishment of an adult zebrafish model of retinal neurodegeneration induced by NMDA. *International Journal of Ophthalmology*, 12(8), 1250–1261. <https://doi.org/10.18240/ijo.2019.08.04>

- MacRae, C. A., & Peterson, R. T. (2015). Zebrafish as tools for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(10), 721–731. <https://doi.org/10.1038/nrd4627>
- Mandrekar, N., & Thakur, N. L. (2009). Significance of the zebrafish model in the discovery of bioactive molecules from nature. *Biotechnology Letters*, 31(2), 171–179. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9868-1>
- Martins, T., Valentim, A. M., Pereira, N., & Antunes, L. M. (2016). Anaesthesia and analgesia in laboratory adult zebrafish: A question of refinement. *Laboratory Animals*, 50(6), 476–488. <https://doi.org/10.1177/0023677216670686>
- Oregon University. (2022). *ZFIN*. The Zebrafish Information Network. <https://zfin.org/>
- Pablo, P., & Paredes, Q. (2022). Factores de riesgo asociados a la diabetes mellitus gestacional. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 38(1), 1–16. <http://orcid.org/0000-0001-8584-5587%0D>
- Samaee, S. M., Seyedin, S., & Varga, Z. M. (2017). An Affordable Intraperitoneal Injection Setup for Juvenile and Adult Zebrafish. *Zebrafish*, 14(1), 77–79. <https://doi.org/10.1089/zeb.2016.1322>
- Schlegel, A., & Gut, P. (2015). Metabolic insights from zebrafish genetics, physiology, and chemical biology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(12), 2249–2260. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1816-8>
- The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. (2003). Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes*, 26(suppl 1), 5–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12502614>
- Tubeisha, Z. A. (2017). Rodent Models of Type 2 Diabetes Mellitus. *Hebron University Research Journal(A)*, 7(7), 32–56. <http://www.hebron.edu/journal>
- Vargas-Vargas, R. A. (2017). Pez cebra (*Danio rerio*) y anestesia. Un modelo animal alternativo para realizar investigación biomédica básica. *Anestesia En México*, 29(1), 86–96.
- Velasco Martin, A., Lorenzo Fernandez, P., Serrano Molina, J. S., & Andres Trelles, F. (2008). *Velázquez. Farmacología Básica y Clínica*. (16th ed.). McGRAW-HILL - INTERAMERICANA DE ESPAÑA.
- Yoganantharjah, P., & Gibert, Y. (2017). The Use of the Zebrafish Model to Aid in Drug Discovery and Target Validation. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 17(18), 2041–2055. <https://doi.org/10.2174/1568026617666170130112109>
- Zang, L., Morikane, D., Shimada, Y., Tanaka, T., & Nishimura, N. (2011). A novel protocol for the Oral administration of test chemicals to adult Zebrafish. *Zebrafish*, 8(4), 203–210. <https://doi.org/10.1089/zeb.2011.0726>
- Zang, L., Shimada, Y., & Nishimura, N. (2017). Development of a Novel Zebrafish Model for Type 2 Diabetes Mellitus. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11.

<https://doi.org/10.1038/s41598-017-01432-w>

Zang, L., Shimada, Y., Nishimura, Y., Tanaka, T., & Nishimura, N. (2013). A novel, reliable method for repeated blood collection from aquarium fish. *Zebrafish*, *10*(3), 425–432. <https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0862>

Zang, L., Shimada, Y., Nishimura, Y., Tanaka, T., & Nishimura, N. (2015). Repeated blood collection for blood tests in adult zebrafish. *Journal of Visualized Experiments*, *2015*(102), 1–10. <https://doi.org/10.3791/53272>

Zhang, Y., Qin, C., Yang, L., Lu, R., Zhao, X., & Nie, G. (2018). A comparative genomics study of carbohydrate/glucose metabolic genes: From fish to mammals. *BMC Genomics*, *19*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4647-4>

7. Apéndice

Protocolo de hiperglicemia en *Danio rerio*

Modelo biológico: Pez cebra (*Danio rerio*)

La población experimental está alojada en el Instituto de Fisiología Celular, Laboratorio 214 Oriente, a cargo del Dr. Fernando López Casillas y bajo el cuidado del M.V.Z Gilberto Morales Villafaña. Se encuentran contenidos en un Rack para peces cebra Zebrafish Stand Alone AH2030 de la marca Aquatic Habitats™, el cual consta de peceras de acrílico, todas se encuentran conectadas a un sistema de purificación y recirculación de agua con la finalidad de mantener, bajo estricto control y monitoreo en tiempo real, las condiciones de limpieza, pH, conductividad, osmolaridad, oxígeno disuelto y temperatura. Son alimentados dos veces al día, dependiendo del protocolo al que estén sometidos, con alimento comercial Tetracolor® y *Artemia salina* L. eclosionada cada 24 h.

Toda el agua necesaria para los organismos se obtiene mediante el proceso de ultrapurificación con los equipos Elix™ y Milli Q™ con la posterior adición de sales Instant Ocean™.

Se realizó la cruce entre las líneas silvestres TAB/WIK y AB/TU de manera que los organismos obtenidos son libres de mutaciones en su fondo genético, alcanzan un tamaño de 2 a 2.5 cm entre los tres y cuatro meses de edad con peso de 250 a 500 mg, características ideales para este protocolo.

Glucómetro

El sistema para monitoreo de glucosa en sangre Contour Plus® está diseñado para que las personas con diabetes hagan un autodiagnóstico y para que los profesionales de la salud vigilen las concentraciones de glucosa en muestras de sangre capilar total fresca, sangre arterial y venosa total o sangre de neonatos. El sistema mide cuantitativamente la glucosa en sangre total dentro de un intervalo de [10 mg/dL] a [600 mg/dL].

Cuenta con tecnología de auto codificación de modo que se codificará automáticamente cada que se inserte una tira reactiva.

Control de calidad

Se realiza con las soluciones control (Normal, Baja o Alta) cuando: (1) Se utiliza el medidor por primera vez; (2) Se abre un nuevo frasco o paquete de tiras reactivas; (3) Se considere que el glucómetro no está funcionando correctamente; (4) Se obtengan resultados de glucosa en sangre repetitivos o inesperados.

Nota: El intervalo de temperatura adecuado para el correcto funcionamiento del glucómetro se encuentra entre 15°C y 35°C.

- Procedimiento
 1. Tomar una tira reactiva y cerrar bien el frasco.
 2. Agitar bien el frasco de solución control (aproximadamente 15 veces) antes de cada uso.

3. Insertar el extremo cuadrado gris en el puerto para tiras reactivas del medidor hasta que este emita un sonido.
4. Esto encenderá el medidor. Aparecerá la imagen de una tira reactiva con una gota de sangre intermitente para indicar que el medidor está listo para el análisis.
5. Quitar la tapa del frasco para verificar que no hay residuos de solución control, después dispensar una gota sobre una superficie limpia no absorbente.
6. Tocar inmediatamente la gota de la solución con la punta de la tira reactiva y mantener el contacto hasta que el medidor emita un sonido.
7. Verificar el valor obtenido con los intervalos impresos en los frascos de tiras reactivas.
8. Quitar la tira y desecharla en los residuos correspondientes.

Fundamento del procedimiento

Se basa en la medición de la corriente eléctrica generada por la reacción de la glucosa con los reactivos presentes en el electrodo de la tira reactiva. La muestra de sangre es absorbida por la punta de la tira reactiva gracias a la capilaridad. La glucosa de la muestra reacciona con la FAD glucosa deshidrogenasa (GDH-FAD) y con el mediador. Se generan electrones, lo que produce una corriente proporcional al nivel de glucosa en la muestra. Después del tiempo de reacción, la concentración de glucosa en la muestra aparece en pantalla.

Tiras reactivas

Están diseñadas para usarse con el medidor de glucosa en sangre Contour Plus®. Se deben guardar a temperatura entre 0°C y 30°C y exclusivamente en su frasco original. Siempre cerrar y ajustar la tapa inmediatamente después de sacar una tira reactiva.

Cuando la sangre en la tira no es suficiente, el glucómetro lo indica y permite completar el volumen en un margen de 5 segundos. Las tiras no son reutilizables.

Composición química

FAD glucosa deshidrogenasa (*Aspergillus sp.*, 4.0 U/tira reactiva), 21%; mediador, 54%; ingredientes no reactivos, 25%.

Limitaciones

1. Conservantes: Utilizar heparina como anticoagulante. No utilizar otros anticoagulantes o conservantes.

Especificaciones del sistema

Especificación	Descripción
Muestra para el análisis	Sangre venosa, arterial o capilar entera.
Resultado del análisis	Referenciado con el nivel de glucosa en plasma o suero.
Volumen de la muestra	0.6 µL
Intervalo de medición	[10 a 600 mg/dL]
Resultados	Obtenidos después de 5 segundos.

Memoria	Almacena los 480 resultados más recientes.
Intervalo de temperatura de funcionamiento del medidor	5°C a 45°C
Intervalo de temperatura de funcionamiento de la solución control	15°C a 35°C
Humedad relativa	10% a 93%

NOTA

SI EL MEDIDOR Y/O LAS TIRAS REACTIVAS SON TRASLADADOS DE UNA TEMPERATURA A OTRA, SE DEBEN ESPERAR 20 MIN. PARA QUE AMBOS SE AJUSTEN A LA NUEVA TEMPERATURA ANTES DE REALIZAR UN ANÁLISIS DE GLUCOSA EN SANGRE.

Anestesia

- **Materiales**

- Agua para acuario
- 3 peceras de acrílico
- Hielo fragmentado
- Termómetro

- **Procedimiento**

1. Colocar lo necesario en las tres peceras de acuerdo con la Tabla 1.

Tabla 1. Especificaciones de contenido de las peceras para anestesia.

Pecera	Contenido	Temperatura
1	Agua para acuario	Ambiente
2	Agua para acuario y hielo fragmentado	15°C a 20°C
3	Agua para acuario y hielo fragmentado	5°C a 10°C

2. Colocar al organismo en la pecera 1, trasladarlo a la pecera 2 y esperar por aproximadamente dos min, posteriormente colocarlo en la pecera 3 y esperar a que este anestesiado (flotación y movimiento opercular disminuidos al mínimo).
3. Extraer al organismo de la pecera y realizar el procedimiento de interés.

Cortado de capilares

Se realiza con el Micropipette Puller P-97, Sutter Instruments. Se utiliza para fabricar micropipetas, pipetas de parche y agujas de microinyección. Presenta un gran control de proceso de extracción y alto grado de reproducibilidad. Contiene un control programable de los parámetros de extracción que permite diseñar pipetas específicas de la aplicación a partir de una amplia gama de composiciones y tamaños de vidrio.

Los capilares utilizados son de 1.0 mm de diámetro externo y 0.58 mm de diámetro interno, estos son cortados con los parámetros mostrados en la Tabla 2, de manera que se obtiene un capilar con diámetro interno menor a 0.29 mm.

Tabla 2. Parámetros para cortar capilares en Micropipette Puller P-97.

Parámetro	Valor
Heat	625
Pull	20
Vel.	50
Time	200

Administración intraperitoneal

Por esta vía se administrarán soluciones de Glucosa y de extractos o moléculas asiladas de microorganismos fúngicos.

- **Materiales**

- Capilares de vidrio cortados, con diámetro interno menor a 0.29 mm.
- Microscopio Olympus™ modelo SZX2- ILLT
- Dispositivo de dispensado de la disolución: Jeringa de insulina acoplada herméticamente a una manguera y en la punta acoplado a un capilar.
- Material necesario para sujetar al organismo.
- Disolución por evaluar.
- Balanza granataria.
- Micropipeta de 0 a 10 μ L.

- **Procedimiento**

1. Pesar los organismos que serán utilizados. Calcular el volumen de glucosa de acuerdo con su peso, se administra 1 μ L de solución por cada 200 mg de peso del pez.
2. Con ayuda del microscopio, cortar la punta del capilar generando un pequeño bisel, de manera que el pez tenga la lesión más pequeña posible y que el capilar no se obstruya durante la aplicación de la solución de glucosa.
3. Colocar el capilar ya cortado en la punta de la manguera para dispensar la solución.
4. Inmovilizar la jeringa en la mesa de trabajo con la ayuda de una cinta adhesiva.
5. Con micropipeta de 0 a 10 μ L tomar el volumen de solución necesario y colocarlo en la tapa de un microtubo limpio.
6. Dejar un volumen de aire en la jeringa y posteriormente tomar el volumen colocado en la tapa del microtubo cuidando bien que se tome el volumen total y que el llenado sea uniforme (evitar burbujas).
7. Anestesiarse al organismo que se va a administrar.
8. Colocarlo en posición decúbito dorsal, llevarlo al microscopio y enfocar correctamente con ayuda de luz incidente superior.

9. Identificar una pequeña zona blanca en el vientre inferior, que se encuentra ligeramente debajo de las aletas ventrales y antes del ano.
10. Incidir con el capilar por la zona indicada hasta ingresar en el peritoneo.
11. Comenzar a dispensar cuidadosamente observando que disminuya el volumen de solución del capilar. En caso de no observar la disminución del volumen reposicionar ligeramente el capilar para evitar alguna obstrucción.
12. Al terminar de administrar la solución retirar el capilar del peritoneo siendo cuidadoso en no causar otra lesión al organismo.
13. Colocar al organismo en agua a temperatura ambiente y vigilar hasta su recuperación.

NOTA: A partir de que el organismo se encuentra anestesiado y fuera del agua se tiene máximo un minuto para completar la administración de glucosa antes de que recupere la consciencia.

Administración oral

Por esta vía se realizará la administración de Sacarosa y extractos o moléculas aisladas de microorganismos fúngicos.

- **Materiales**

- Microscopio Olympus™ modelo SZX2- ILLT
- 2 pinzas de disección para pez cebra
- Micropipeta de 0 a 10 μ L
- Balanza granataria
- Microbalanza
- Alimento comercial Tetracolor®
- Sacarosa (o molécula a evaluar).
- Peceras de acrílico
- Vidrio de reloj o portaobjetos
- Agua para acuario
- Mortero

- **Procedimiento**

1. Pesar a los organismos y separarlos, uno por pecera.
2. Moler en el mortero una porción de alimento Tetracolor® e ir agregando gotas de 1 μ L de agua hasta formar una pasta.
3. Pesar la cantidad necesaria de Sacarosa (o la molécula que se vaya a administrar) de acuerdo con el peso del organismo, así como una cantidad equivalente de la pasta de alimento Tetracolor®.
4. Colocar la cantidad pesada de pasta y Sacarosa sobre el vidrio de reloj o portaobjetos y, con ayuda del microscopio y las pinzas, recubrirla totalmente con la pasta de alimento para formar un gránulo, este debe de ser el adecuado para que el organismo lo consuma en una sola intención, para ello, el tamaño del gránulo no debe exceder la distancia que hay entre sus ojos.
5. Dejar secar el gránulo bajo la luz del microscopio por máximo 1 minuto y verificar que la Sacarosa no se disolvió. Terminar secado a temperatura ambiente.

6. Agregar el granulo seco a la pecera con el organismo previamente separado y observar que lo consuma en su totalidad.

Toma de muestra sanguínea

- **Materiales**

- Capilares de vidrio cortados, con diámetro interno menor a 0.29 mm.
- Pinzas de disección para pez cebra.
- Microscopio Olympus™ modelo SZX2- ILLT
- Caja Petri.
- Heparina.
- Dispositivo de toma de muestra: Manguera de plástico corta, de un lado acoplada a una boquilla removible selladas herméticamente y por el otro con un sujetador elástico para el capilar.
- Papel Parafilm
- Glucómetro y tiras reactivas Contour Plus®.
- Servitoallas.

- **Procedimiento**

1. Con ayuda del microscopio, cortar la punta del capilar, generando un pequeño bisel, de forma que se lesione lo menos posible al organismo y también se pueda evitar la obstrucción durante la toma de muestra.
2. Colocar el capilar en el dispositivo de toma de muestra.
3. Heparinizar el capilar: Con ayuda de la manguera y la boquilla absorber levemente con la boca un poco de heparina y posteriormente sacarla de manera que solo las paredes del vidrio queden heparinizadas.
4. Utilizar una servitoalla humedecida con agua de acuario para colocarla sobre una tapa de caja Petri.
5. Anestesiarse al organismo.
6. Colocarlo en posición decúbito lateral sobre la tapa de la caja Petri.
7. Con ayuda del microscopio con luz incidente de abajo, ubicar la zona de punción que se localiza debajo de la columna, a la altura del ano y máximo 1 cm hacia la cola.
8. Con ayuda del capilar retirar dos o tres escamas de la zona donde se va a tomar la muestra.
9. Incidir con el capilar cuidadosamente hasta que aparezca una pequeña cantidad de sangre en la punta del capilar, inmediatamente absorber con cuidado en la boquilla para obtener el volumen necesario para la tira reactiva (aproximadamente 0.6 µL, equivalente a 0.5 cm del capilar). SI AL INCIDIR CON EL CAPILAR NO SE LOGRA ENCONTRAR LA AORTA SE DEBE REPOSICIONAR LIGERAMENTE PARA EVITAR CAUSAR UNA LESIÓN IMPORTANTE.
10. Retirar cuidadosamente el capilar conservando el ángulo de punción.
11. Colocar al organismo en agua a temperatura ambiente.

12. Vigilar hasta su recuperación.

NOTA: A partir de que el pez se encuentra anestesiado y fuera del agua se tiene máximo un minuto para completar la toma de muestra sanguínea antes de que recupere la consciencia.

Eutanasia

Posterior a los experimentos no se realizará eutanasia obligatoria, a menos que se presente una lesión grave. Después del experimento se les mantiene con cuidados y alimentación normal. Un mes después se pueden volver a realizar procedimientos con estos organismos.

Se dará eutanasia a los peces que tengan lesiones que no les permita la movilidad y flotabilidad normal para esta especie, se realizará por sobredosis del anestésico MS-222, se encontrará disuelto en agua y en ella se colocará al organismo.

Disposición de residuos biológicos.

Modelo biológico

Todos los residuos biológicos generados son procesados por una compañía especializada que cumple con las directrices de acuerdo con la normatividad del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, a la cual este protocolo está apegado.

Tiras reactivas

Se colocan en bolsa roja de RPBI para su posterior disposición por la compañía especializada de acuerdo con la normatividad del Instituto de Química, UNAM.