

Uso del modelo de pez cebra como herramienta para evaluar la actividad antiinflamatoria y antioxidante de los alimentos. Revisión de literatura

Use of the zebrafish model as a tool to assess the anti-inflammatory and antioxidant activity of foods. Literature review

Cristina Arteaga¹, Verónica Guanga², María Fernanda Marizande³, Ruth Borja⁴

¹ Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias de la Salud, Ambato, Ecuador, ca.arteaga@uta.edu.ec

² Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias de la Salud, Ambato, Ecuador, ve.guanga@uta.edu.ec

³ Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias de la Salud, Ambato, Ecuador, mf.marizande@uta.edu.ec

⁴ Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, Ambato, Ecuador, rborja9883@uta.edu.ec

DOI: <https://doi.org/10.31243/id.v16.2022.1665>

Resumen

Este trabajo se basa en identificar las técnicas de análisis que se emplean para evaluar el efecto antioxidante y antiinflamatorio empleando el modelo de pez cebra. Para realizar la búsqueda de artículos científicos se utilizó las bases de datos Science Direct, Google Scholar y SciELO empleando los términos zebra fish, antioxidant, anti inflammatory, model, *Danio rerio*. Se revisaron cincuenta artículos, de los cuáles se eligieron treinta y tres para realizar esta revisión y fueron clasificados según la fuente de extractos vegetales, compuestos extraídos de plantas, compuestos químicos y otras fuentes, de cada artículo se destacó los análisis *in vivo*, *in vitro* y las condiciones de tratamiento empleado en el pez cebra, con el objetivo de analizar las técnicas más relevantes que se pueden realizar en este modelo y conocer los análisis complementarios que se pueden realizar al pez cebra.

Palabras clave:

Pez cebra, antiinflamatorio, antioxidante, modelo

Abstract

The use of metabolites obtained from plants that are suitable for human consumption requires a prior evaluation to measure their effectiveness and adverse effects. Bioethics committees control the use of laboratory animals for these purposes, making working with these models imply high costs and more time to carry out laboratory tests. Hence, zebrafish have great advantages as an animal model, because in their first hours of development they are transparent, their growth is rapid, simple techniques can be used for their study, oxidative and inflammatory stress can be induced to evaluate the anti-inflammatory response and oxidative stress in a similar way to the processes that occur in humans. This work is based on identifying the analysis techniques used to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory effect using the zebrafish model. To search for scientific articles, the Science Direct, Google Scholar and SciELO databases were used using the terms zebra fish, antioxidant, anti inflammatory, model, Danio rerio. Fifty articles were reviewed, of which thirty-three were chosen to carry out this review and were classified according to the source of plant extracts, compounds extracted from plants, chemical compounds and other sources, of each article the in vivo, in vitro analyzes were highlighted. and the treatment conditions used in zebrafish, with the aim of analyzing the most relevant techniques that can be performed in this model and knowing the complementary analyzes that can be performed on zebrafish.

Keywords:

Zebrafish, antiinflammatory, antioxidant, model

Introducción

La ciencia siempre ha sabido aprovechar los productos naturales para obtener nuevos medicamentos o para usar los metabolitos de plantas y así obtener nuevos compuestos, (Armas, 2016). Los metabolitos son obtenidos de varias fuentes, una de las más usadas son las fuentes vegetales, además se puede obtener de animales, microorganismos,

(Camacho-Escobar et al., 2020). Los metabolitos utilizados en medicina se producen en el metabolismo secundario de los organismos, teniendo diversas aplicaciones en varios campos de la salud y alimentación, actualmente se potencia con ingeniería genética con lo que se obtiene mayor producción y se disminuyen costos (Camacho-Romero et al., 2017). El requerimiento de nuevos medicamentos para paliar dolencias existentes o nuevas enfermedades, hace que se siga investigando nuevos metabolitos y principios activos de plantas útiles para el ser humano, la constante exploración de nuevos productos puede presentar ciertos inconvenientes como la toxicidad de los compuestos, (Armas, 2016), pudiendo ocasionar perjuicios para la salud, por ello, es preciso realizar un estudio preliminar de estos compuestos, así como de los efectos toxicológicos que pudieran presentar en seres humanos, (Castro, 2013).

La evaluación de los metabolitos incluye la determinación de la dosis máxima tolerable, que permite saber la dosis a la que es seguro su uso, Además se debe estudiar los efectos que pudieran producir por su uso continuo, para lo cual se emplea varios modelos animales *in vivo*, (Saeidnia et al., 2016), esto permite aumentar la seguridad de los productos para ser usados por seres humanos, además de un acercamiento al efecto real del metabolito en células, (Moctezuma Viera, 2020), lo que se complementa con análisis *in vitro*, asimismo se evalúa la citotoxicidad, así como su efecto, en el desarrollo de embriones o en tejidos específicos, (Escobedo-Moratilla, Abraham; Barba de la Rosa, Ana Paulina; Pérez-Urizar, 2015).

Los modelos *in vivo* permiten optimizar tiempos de investigación, evita usar seres humanos para pruebas y asegurar la inocuidad de metabolitos en desarrollo, (Acevedo Fernández et al., 2013), pero varias organizaciones tienen conflicto con el uso de animales para este fin. Sin embargo, es importante observar el efecto de nuevos compuestos en organismos vivos y por tanto sigue siendo la opción más utilizada para probar metabolitos y principios activos, (Fina et al., 2013).

Uno de los principales modelos animales empleados son los roedores, como ratones, ratones y conejos, sin embargo, en los últimos años el pez cebra se ha posicionado como un referente como modelo animal, (Lawrence, 2007), gracias a su rápida reproducción, la transparencia de su piel y la consecuente observación directa de efectos en sus órganos internos (White et al., 2008), son fáciles de manejar y son homólogos en un 70% con el genoma humano y comparten un 84% de similitud de genes asociados a enfermedades en seres humanos, (Espinosa, 2016). Estas características hacen que el

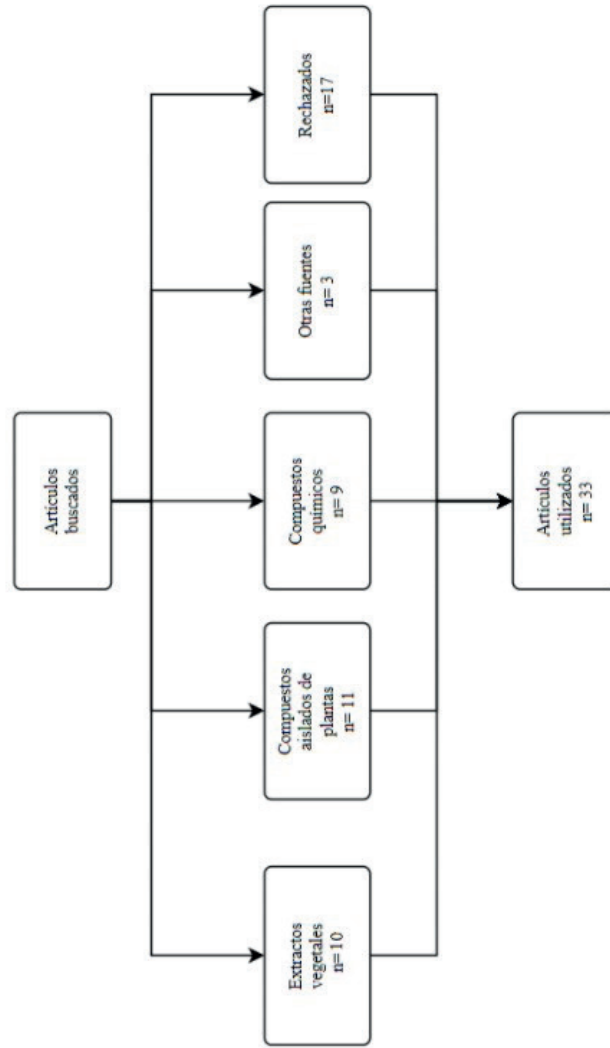
pez cebra sea uno de los mejores modelos para probar metabolitos, extractos o matrices alimentarias pues las cantidades de compuestos que se requieren son mínimas y los costos se reducen. También permite observar determinado efecto durante todas sus etapas de vida, (Kettleborough et al., 2013). Por todo lo antes mencionado podemos decir que el objetivo de esta revisión es analizar los distintos tratamientos, metabolitos y resultados de actividad antioxidante y antiinflamatoria empleada en modelos basados en pez cebra para poder compararlos y considerar futuras aplicaciones en proyectos de investigación.

Metodología

El presente estudio se basó en una revisión de artículos científicos, que se realizó empleando bases de datos como Science Direct, Google Scholar y SciELO (Scientific Electronic Library Online). Se identificó publicaciones utilizando palabras de búsqueda y términos que contenían "zebrafish", "antiinflamatorio" y "antioxidante". En particular, las principales palabras clave buscadas incluyeron "modelo de pez cebra", "modelo in vivo", "estrés oxidativo", "inflamación" y "toxicología". Se revisaron un total de 50 artículos de los cuales 33 se emplearon para la revisión bibliográfica basados en el efecto antioxidante y antiinflamatorio de los compuestos empleados en modelos de pez cebra, se incluyeron artículos originales y libros. Se verificó que las publicaciones revisadas no sobrepasen los 10 años de haber sido publicados. Las publicaciones se seleccionaron según su relevancia y actualidad.

Resultados

Figura 1. Resumen del número de artículos revisado



Fuente: Elaboración propia a partir de búsqueda bibliográfica (2021).

Se colocaron solo los análisis realizados en pez cebrá, sin embargo, los análisis in vitro realizados si se discutieron.

Tabla 1. Trabajos de extractos vegetales in vivo

Compuesto	Concentración	Etapa expuesta	Parámetros in vivo evaluados	Metodología de parámetros	Referencia
Extractos de sofrito de tomate	0,5g/400 ml	4 d.p.f	1. Ensayo de migración de neutrófilos	1. Tinción con kit Leucognost pox y observación en microscopio NIKON eclipse TS100	(Arteaga, Bustillos y Gómez, 2020)
Extracto fenólico liofilizado de <i>Argentine Patagonia barberry</i>	5 µg/ml	4-6 h.p.f	1. Generación de ROS intracelular	1. Ensayo de fluorescencia DCFH-DA, se usa reactivo DCFH-DA y se observa en cámara Moticom 2000	(Boeri, et al., 2020)
Proteínas liofilizadas aisladas del extracto	0 y 0.25 mg/ml	1 h.p.f	1. Mortalidad, 2. Morfología	1.2. Microscopio estereoscópico	
Butirato	30 mM	5 d.p.f	1. Cuantificación de ácidos grasos cortos, 2. Recuperación de cola, 3. Imagen, 4. Seguimiento de neutrófilos, 5. PCR, 6. Inyección de CRISPR, 7. Detección de acetilación de histonas	1. Mediante columna de capilar HPFFAP, 2. Corte y observación de crecimiento, 3. Fluorescencia y observación con microscopio, 4. ImageJ software, 5. qPCR para primers 18s y hcar1, 6. Inyección de solución con ARN y Cas9 en membrana embrionaria, 7. SDS page	(Cholán, et al., 2020)

Compuesto	Concentración	Etapas expuesta	Parámetros in vivo evaluados	Metodología de parámetros	Referencia
Extracto liofilizado de la fracción de etanol de <i>Clerodendrum cyrtophyllum</i>	5, 20 y 40 µg/mL	3 d.p.f	1. Generación de ROS intracelular, 2. PCR, 3. Actividad antiinflamatoria	1. Ensayo DCF-DA, 2. qPCR para genes <i>sod</i> , <i>gpx4</i> , <i>hsp70</i> , y <i>gadd45bb</i> . 3. qPCR para genes <i>β-actin</i> , <i>efl1-α</i> , <i>il-1β</i> , <i>il-8</i> , <i>tnf-α</i> , <i>mpo</i> , <i>c3a</i> , <i>pla2</i> , <i>nf-κb</i> , <i>il-10</i>	(Nguyen, et al., 2020)
Swertiamarin	2.7, 8.1, 40, 81, 162, y 243 µM	2 h.p.f	1. Enzimas marcadoras ALT y AST, 2. Nivel de Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa, 3. Actividad de Cat, 4. Actividad de Sod, 5. Actividad de GSH y GPx, 6. Nivel de GST, 7. Peroxidación lipídica	1. Colorimetría de la reacción de aminoácidos aspartato y alanina, 2. Método de Shiosaka, 3. Oxidación de pirogalol, 4. Descomposición de H2O2, 5. Consumo de DTNB, 6. Formación de complejos con CDNB, 7. Formación de MDA	(Perumal, Gopal y Subramanian, 2021)
Extracto de <i>Parmotrema austrosinense</i> en acetona	200, 400, 600 y 1000 µg/ml	1 d.p.f	1. Mortalidad, 2. Histopatología	1. Microscopio electrónico, 2. Tejido intestinal fijado y observado mediante microscopio	(Poormina, et al., 2019)
Extracto de <i>Hypericum hookerianum</i>	0.05mg/mL, 0.1mg/mL y 0.5mg/mL	1 h.p.f	1. Mortalidad, 2. PCR	1. Microscopio para determinar ritmo cardíaco y tasa de eclosión, 2. RT-PCR para genes <i>L-1b</i> , <i>IL-6</i> , <i>cat</i> , <i>Cu-Zn</i> , <i>sod</i>	(Pradeep, 2019)
Extracto de <i>Moringa oleifera</i>	3, 10, 30, 100, 300 y 1,000 µg/mL	3001 h.p.f	1. Mortalidad, 2. Morfología	1. Microscopio electrónico, 2. Microscopio electrónico	(Syazleen, et al., 2020)

Compuesto	Concentración	Etapas	Parámetros in vivo evaluados	Metodología de parámetros	Referencia
Extracto de corteza de <i>Cassia fistula</i>		10 h.p.f	1. Toxicidad, 2. Actividad antioxidante	1. Observación en microscopio de supervivencia, cardiotoxicidad, neurotoxicidad y hepatotoxicidad, 2. Ensayo con DCFDA y observación en microscopio de fluorescencia	(Udaya, et al., 2020)
Polisacáridos de <i>Notopterygium franchetii</i> Boiss	10, 12.5, 25 y 50 µg/mL	4 h.p.f	1. Propiedades antiinflamatorias	2. Fluorescencia mediante DAF-FMDA	(Wang y Liu, 2020)

Fuente: Elaboración propia en base a los resultados de la investigación bibliográfica

Tabla 2. Trabajos de compuestos vegetales aislados ensayados en pez cebra

Compuesto	Concentración	Etapas	Parámetros in vivo evaluados	Metodología de parámetros	Referencia
Naringenina,	Naringenin (20	0 h.p.f	1. Morfología, 2. Mortalidad	1. Microscopio, 2. Microscopio	(Arteaga et al., 2021)
apigenina, rutina,	μM), oleuropein				
oleuropeina, ácido	(15 μM), rutin				
clorogenico,	(10 μM), ácido				
curcumina,	clorogenico (20				
lycopene B, β-	μM), apigenin (10				
carotene y	μM), curcumin				
astaxanthin	(15 μM), lycopene				
	(20 μM),				
	astaxanthin				
	(20 μM), y β-				
	carotene (25 μM)				

Compuesto	Concentración	Etapas	Parámetros in vivo evaluados	Metodología de parámetros	Referencia
3-Bromo-4,5-Dihidroxi benzaldehído	12.5, 25, y 50 μM	7-9 h.p.f	1. Producción de ROS intracelular, 2. Peroxidación lipídica, 3. Tinción nuclear, 4. Ciclo celular, 5. Análisis de proteínas, 6. Inmunofluorescencia, 7. Apoptosis	1. Método con DCHF-DA, 2. Método DPPP, 3. Uso de (Cho et al., Hoechst 3342, 4. Resistencia frente a peróxido de hidrógeno y observación en citómetro, 5. Western blot para anti-bax, anti-bcl-xL, anti-PARP, anti-cleaved caspase-9 anti-phospho-NF- κ B p105, anti-phospho-NF- κ B p65, anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody and anti-mouse IgG, HRP-linked antibody, 6. Método de	(Cho et al., 2019)
Capsaicina, ácido carnósico, cinnamaldehído, curcumina, dialil trisulfido, eugenol,	1, 5, 25 y 125 μM	6 d.p.f (larva)	1. Mortalidad	1. Microscopio estereoscópico	(Endo et al., 2020)
Polisacáridos sulfatados de <i>Padina boryana</i>	25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$	7-9 h.p.f (embriones)	1. Screen de actividad de radicales libres, 2. Expresión de CAT, SOD, Nrf2, Keap1, 3. Generación de ROS intracelular, 4. Peroxidación lipídica, 5. Apoptosis	1. DPPH y ensayo DCF DA, 2. Análisis de Western Blot (Jayawardena luego de reaccionar células con H ₂ O ₂ 3. Mediante análisis et al., 2020) DCFDA, 4. Análisis DPPP, 5. Análisis DPPP, tinción de naranja de acridina y observación por microscopio digital	

Compuesto	Concentración	Etapas	Parámetros in vivo evaluados	Metodología de parámetros	Referencia
Floroglucinol, eckol, dieckol, eckstolonol y triphloroethol	50 µM	3 h.p.f	1. Medición de ritmo cardíaco, 2. Generación de ROS intracelular, 3. Peroxidación lipídica, 4. Apoptosis	1. Medición a 35 hpf de las contracciones bajo microscopio, (Kang, Cha, et al., 2013) 2. Método con DCFH-DA, 3. Mediante DPP, 4. Tinción de naranja de acridina	
Dieckol	10 y 20 µM	7-9 h.p.f	1. Efecto protector frente a estrés por etanol, 2. Citotoxicidad LDH, 3. Expresión de <i>ax</i> , <i>Bcl-xL</i> , <i>cleaved caspase-3</i> , <i>PAR</i> , 4. Peroxidación lipídica. 5. Apoptosis	1. Ensayo MTT y medición por ELISA 2. Kit de detección (Kang, Kim, et al., 2013) 3. Western blot, 4. Método DPPP, 5. Tinción de naranja de acridina	

Compuesto	Concentración	Etapas	Parámetros in vivo evaluados	Metodología de parámetros	Referencia
Morina	20 µM, 40 µM, 60 µM, 80 µM, y 100 µM	2 h.p.f	1. Prueba de preferencia en la partición, 2. Prueba de compartimiento horizontal, 3. Ensayo de superóxido dismutasa, 4. Ensayo de catalasa, 5. Peroxidación lipídica, 6. Glutación reducido, 7. Actividad de glutación peroxidasa, 8. Actividad de glutación S transferasa, 9. Actividad de acetilcolinesterasa,	1. Orientación espacial de peces al pasar de una cámara a otra, 2. Tiempo de recorrido en un segmento desconocido, 3. Espectroscopía de la reacción con TrisHCl, 4. Espectroscopía de un lavado con buffer fosfato, dicromato de potasio y ácido acético, 5. Método TBARS, 6. Método con DTNB, 7. Espectroscopía de consumo de NADPH, 8. Espectroscopía de GSH y cloro di nitro benzeno, 9. Espectroscopía del consumo de acetilcolina iodida, 10. Método de Griess, 11. Microscopia fluorescencia luego de tratamiento con DCFDA, 11. Tinción con naranja de acridina, 12. qPCR	(Issac et al., 2021)

Compuesto	Concentración	Etapas	Parámetros in vivo evaluados	Metodología de parámetros	Referencia
Polifenoles de <i>Spartina alterniflora</i> y <i>Salicornia fragilis</i>	1, 5 y 10 µg/mL	7 d.p.f	1. Actividad osteogénica	1. Crecimiento frente al extracto y disección de la cabeza de las larvas observadas por microscopio	(Roberto et al., 2021)
Polisacáridos sulfatados de <i>Spirulina platensis</i>	0.5, 1.0, 1.5 y 2% de alimento	15 d.p.f	1. Crecimiento, 2. Reproducción, 3. Índice gonadosomático, 4. Análisis histológico	1. mediante diferencia de peso, 2. Mediante observación de huevos eclosionados y larvas supervivientes, 3. Método de Strum, 4. Método de Bruton con hematoxilina y eosina.	(Rajasekar et al., 2019)
(-)-loliolide	0, 6.25, 12.5, 25 µg/mL	7-9 h.p.f	1. Mortalidad, 2. Cantidad de ROS intracelular, 3. Peroxidación lipídica, 4. Apoptosis	1. Microscopio para determinar ritmo cardíaco 2. Método de DCFDA, 3. Método de DPPH, 4. Método con naranja de acridina	(Kim et al., 2020)

Compuesto	Concentración	Etapas	Parámetros in vivo evaluados	Metodología de parámetros	Referencia
Flavonoides de <i>Polygonatum odoratum</i>	10, 20, 50 y 100 µg/mL	4 h.p.f	1. Contenido de ROS, 2. Actividad de MAD, 3. Actividad de SOD	1. Fluorescencia con DCFH-DA, 2. Medición de absorbancia de mezcla centrifugada con etanol anhidro, 3. Medición de absorbancia de centrifugado con solución S	(Xia et al., 2021)

Fuente: *Elaboración propia en base a los resultados de la investigación bibliográfica*

Tabla 3. Trabajos de compuestos químicos en pez cebra

Compuesto	Concentración	Etapas	Parámetros in vivo evaluados	Metodología de parámetros	Referencia
Ulexita	5, 10, 20 y 40 mg/l	14 d.p.f	1. Concentración de proteínas, 2. Actividad de SOD, 3. Actividad de CAT, 4. Actividad de GPx, 5. Actividad de MPO, 6. actividad de paraoxonasa y arilesterasa, 7. Ratio de hidrólisis de paraxona 8. Peroxidación lipídica, 9. Actividad de Caspasa-3, 10. Determinación de daño de ADN por nivel 8-OHdG	1. Método de Bradford, 2. Densidad óptica de reacción con xantina y xantina oxidasa, 3. Método de Aebi, 4. Oxidación de NADPH midiendo su absorbancia, 5. Oxidación de o-dianicidina, 6. Kits comerciales, 7. Absorbancia a 37 C, 8. Método TBARS, 9. Kit de Elisa, 10. Kit comercial	(Alak, et al., 2020)
MeO-PEG-b-PMOT	1mM, 3 mM, 10 mM, 30 mM	5 d.p.f (embriones)	1. Mortalidad, 2. expresión de gstp1, 3. Biodistribución en células, 4. Morfología	1. Observación en microscopio 2. Dimetil maleato y sondas de ARN, 3. exponer a RNP marcadas y expuestas a fluorescencia electrónica, 4. observación en microscopio	(Bong, et al., 2016)
Difenil diselenida	3.0 mg/Kg DD de alimento	4-6 m.p.f (pez adulto)	1. Glucosa en sangre, 2. Preparación de tejidos, 3. Peroxidación de lípidos, 4. proteínas carboniladas, 5. niveles de tioles no proteicos, 6. ensayo de catalasa, 7. ensayo de superóxido dismutasa, 8. glutatión peroxidasa, 9. glutatión de s-transferasa, 10. RT-PCR	1. Glucómetro, 2. Homogeneizar el cerebro con Tris-HCl, 3. método TBARS, 4. Espectroscopia con solución tratada con DNPH, buffer de desnaturalización, etanol, acetato de etilo, 5. Espectroscopia a muestras tratadas con TSA y DTNB 6. Mezclar con buffer fosfato de potasio y H2O2, se midió la reducción de H2O2 por espectroscopia, 7. formación de adenocromo por	(Dos Santos, et al., 2020)

Compuesto	Concentración	Etapas	Parámetros in vivo evaluados	Metodología de parámetros	Referencia
		expuesta		espectroscopía, 8. Espectroscopía de la oxidación de NADPH, 9. Espectroscopía de la reducción de glutatión por CDNB, 10. para genes de enzimas antioxidantes	
Abamectina	0.5, 10, 15, 20 y 25 µg/l	7 d.p.f (pez joven)	1. Actividad de superóxido dismutasa, 2. Poder antioxidante para reducir hierro, 3. actividad de glutatión oxidasa, 4. glutatión reducido, 5. concentración de proteínas, 6. expresión de genes	1. Espectroscopía de la reducción de NBT, 2. Espectroscopía de la muestra con mezcla con TPTZ y FeCl ₃ , 3. Espectroscopía de la reducción de NADPH, 4. Método de Beutler espectroscopía de la muestra con tratamiento de solución Rasul y DTNB, 5. Método de Bradford, espectroscopía de la muestra con etanol, ácido fosfórico y azul de Coomassie, 6. Real time PCR con primers <i>cyp1a</i> , <i>vfg</i> , y β - <i>actin</i>	(Hanachi, et al. 2021)
Polietileno tereftalato	5, 10, 5000 µg/L				
Fluralano	2.00 y 0.20 mg/L	7 d.p.f (pez joven)	1. Toxicidad aguda, 2. Bioconcentración y eliminación, 3. Respuesta enzimática antioxidante (CAT, GSH-PX, GTS, SOD y CarE)	1. Concentración de furalano en agua con peces expuestos al compuesto y tiempo de muerte de cada pez, 2. Análisis de agua en período de bioconcentración y eliminación, 3. Uso de kits de Nanjing Jiancheng	(Jia, et al., 2017)
Monobutil pftalato	0, 0.5, 5, 10 mg/L	Pez adulto	1. Actividad de SOD, GSH-Px, CAT, MDA, NaKATpasa, CaMgATPasa, ALT, AST, 2. PCR, 3. Análisis histológico, 4. Apoptosis de hepatocitos	1. Uso de kits de Nanjing Jiancheng, 2. RT-PCR de expresión de genes (<i>sod</i> , <i>cat</i> , <i>gpx</i> , <i>Nrf2</i> , <i>HO-1</i>), 3. Extracción de hígado, fijación de la muestra tratada y observación mediante microscopio 4. Kit Jiancheng Nanjing y citómetro de flujo 5. Método MTT, espectroscopía luego de tratamiento con dimetil sulfoxido	(Jiao, et al., 2019)

Compuesto	Concentración	Etapas	Parámetros in vivo evaluados	Metodología de parámetros	Referencia
Vitamina E	2.62, 52.34, y 101.27 mg/kg	15 d.p.f	1. Actividad de superóxido dismutasa, 2. Actividad de GSH-PX 3. Actividad de peroxidasa, 4. PCR, 5. Western blot 6. Análisis de ácidos grasos, 7. Análisis histológicos	1. Método de xantina oxidasa, 2. Espectroscopía de oxidación de NADPH, 3. Espectroscopía, 4. qPCR para genes <i>nt10b</i> , <i>GSK-3β</i> , <i>PPARγ</i> , <i>β-catenin</i> , y <i>β-actin</i> , 5. SDS PAGE y gel con anticuerpos para <i>β-catenin</i> , <i>β-Actin</i> y <i>GSK-3β</i> , 6. Esterificación de ácidos grasos con metanol y hexano, luego cromatografía GC-MS, 7. Fijación y observación por microscopio	(Liu, Yu, Zhang, 2020)
Ketoprofeno	1, 10 y 100 µg/ml	3 h.p.f	1. Toxicidad, 2. Marcador de oxaloacetil transaminasa y piruvato glutamino transaminasa, 3. LDH, 4. ATPasa unida a la membrana, 5. Actividad de SOD, 6. Actividad de Cat, 7. Actividad de GSH, 8. Actividad de GPx, 9. Actividad de GST, 10. Peroxidación lipídica, 11. Histopatología	1. Observación de movimiento, respiración y nado, (Rangasamy, et al., 2018) 2. Método de Reitman y Frankel, 3. Método de Tietz, 4. Método de Shiosaca mediante espectro UV, 5. Método de Marklun, 6. Método de Aebi consumo de H ₂ O ₂ , 7. Método de Ellman, 8. Método de Habig, producción de CDNB, 9. Método de Devasagayam, producción de MDA, 10. Fijación en placa y observación mediante microscopio trinocular	
Resveratrol	10 µg/mL	3 h.p.f	1. Generación de ROS intracelular, 2. Apoptosis, 3. Actividad de superóxido dismutasa, 4. PCR, 5. Ensayo de EROD	1. Microscopio de fluorescencia para reacción con DCFH-DA, 2. Mediante naranja de acridina, 3. Kit de Nanjing, 4. Microscopio de fluorescencia con anticuerpos 8-OHdG, y H2AX, <i>cleaved-caspase 3</i> , 4. qPCR para genes <i>Gapdh</i> y <i>Elfa</i> , 5. Fluorescencia de la reacción con 7-etoxiresorufina	(Ren, et al., 2020)

Fuente: *Elaboración propia en base a los resultados de la investigación bibliográfica*

Tabla 4. Trabajos de otras fuentes en pez cebra

Compuesto	Concentración	Etapas	Parámetros in vivo evaluados	Metodología de parámetros	Referencia
Hidrolizado de lisosoma de huevo blanco de gallina	0, 156, 312, 625, 1250, 2500, 5000	48 h.p.f (larva)	1. Peroxidación de lípidos, 2. Mortalidad, 3. Morfología	1. Método TBARS, 2. Microscopio estereoscópico 3. falta de formación de somitas, falta de desprendimiento de la yema de la cola del saco vitelino por microscopio estereoscópico	(Carrillo et al., 2016)
58.000 U/ml	µg/ml				
Expresión de Nrf2a en peces GMO		1 h.p.f	1. Morfología, 2. Glutatión y cisteína redox, 3. PCR, 4. Apoptosis	1. Microscopio de luz, 2. HPLC, 3. qPCR para genes <i>actb</i> , <i>b2m</i> , 4. Ensayo con naranja de acridina	(Sant et al., 2018)
Liofilizado de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Bifidobacterium longum</i>	12% en alimento	1 d.p.f	1. Motilidad, cinética y concentración de esperma, 2. Peso, 3. Comportamiento	1. Microscopio óptico triocular de contraste de fase 2. Microbalanza, 3. Observación mediante cámaras	(Valcarce et al., 2019)

Fuente: *Elaboración propia en base a los resultados de la investigación bibliográfica*

Discusión

Material bibliográfico

De una búsqueda en las bases de datos Elvieser-Scopus, PubMed y Springer se tomó 50 artículos según la temática que podían encajar con la revisión bibliográfica, de estos se descartó a 17 artículos, quedando 33 artículos seleccionados para su revisión, el descarte se dio por un análisis de los procedimientos y por los ensayos que se realizaron en cada artículo y así asociar los métodos de análisis para determinar estrés oxidativo e inflamación empleando en modelo de pez cebra.

Extractos vegetales

Las plantas son una fuente de metabolitos secundarios más importantes de la naturaleza, la generación de extractos y su aplicación en tratamientos o para identificar nuevas sustancias específicas que sirven para elaborar medicamentos, el potencial de estos extractos es de gran importancia para la industria alimenticia y farmacéutica.

En una primera fase de estudio de metabolitos se observó que en varios estudios emplearon extractos vegetales tanto para las pruebas de actividad antioxidante y antiinflamatoria, cinco de los estudios revisados emplearon extractos, principalmente liofilizados, ya que (Boeri et al., 2020) y (Nguyen et al., 2020) realizaron la extracción en disolventes orgánicos que son tóxicos para el pez cebra, por lo que se requiere la eliminación previa de estos solventes para poder usar el compuesto, mientras (Pradeep et al., 2019) usó la fracción en etanol, realizando ensayos para determinar estrés oxidativo directamente con el extracto; esto indica que el estado del producto final del metabolito es un factor que puede incidir en la actividad antioxidante y análisis in vivo del modelo.

Al ser compuestos no purificados los que se utilizan en estas fases, se requieren análisis de estructura y composición, los métodos más empleados para esto son HTPLC (cromatografía de capa fina de alto rendimiento), caracterización por electroforesis, inhibición de proteasas y digestibilidad de manera in vitro, además de actividad antioxidante utilizando DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo); (Pradeep et al., 2019) implementó biocompatibilidad y (Boeri et al., 2020) digestión gástrica e intestinal como pruebas relevantes.

Mientras que en las pruebas con el modelo de pez cebra, se realizaron ensayos de mortalidad mediante microscopio electrónico, con la medición del ritmo cardíaco y la tasa de eclosión de los peces, además de observar los cambios morfológicos por este mismo método; (Nguyen et al., 2020) y (Boeri et al., 2020) usaron el ensayo con DCF-DA (diclorodihidrofluoresceína diacetato), también conocido como DCFH-DA, para medir la generación de radicales intracelulares, esta es una técnica de fluorescencia basada en la tinción de células y la intensidad de reacción con los ROS (especies reactivas de oxígeno), (Pradeep et al., 2019) usó PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en tiempo real (qPCR) para identificar la expresión de genes relacionados con la actividad antioxidante, debido a que el extracto puede servir tanto como antioxidante o como un estimulante para la actividad antioxidante dentro del individuo, estudiaron los genes *L-1b*, *IL-6*, *Cat*, *Cu-Zn*, *SoD*; (Cholan et al., 2020) también uso qPCR pero para primers específicos *18s* y *hcar1*. Solo (Poornima et al., 2019) realizó un análisis histopatológico del intestino. (Arteaga et al., 2020) analizó el efecto sobre la migración de neutrófilos como parte del proceso antiinflamatorio empleando extracto de sofrito de tomate desgrasado, empleando técnicas de tinción de los neutrófilos con el kit Leucognost pox, (Cholan et al., 2020) en cambio realizó el seguimiento de neutrófilos con fluorescencia y un software, al igual que (Wang & Liu, 2020) usaron otros marcadores de fluorescencia para esta proceso.

Otro de los métodos más comunes en estos estudios, fueron las cuantificaciones de actividad enzimática, (Perumal et al., 2021) realizaron varios análisis para enzimas CAT (catalasa), SOD (superóxido dismutasa), GSH (glutación reducido), GPx (glutación peroxidasa), GST (glutación S-transferasa), además de peroxidación lipídica, si bien, en este grupo de metabolitos no se observó una gran presencia de estos estudios, en los otros grupos se incrementa la importancia de los mismos.

Se usó huevos fecundados en etapas tempranas de desarrollo, con (Mohamad Shariff et al., 2020), (Pradeep et al., 2019) y (Boeri et al., 2020) a 1 hora post fertilización (h.d.f), (Perumal et al., 2021), (Wang & Liu, 2020), (Boeri et al., 2020) entre 2 y 6 h.p.f, (Udaya et al., 2020) ocupó peces de 10 h.p.f, mientras que, en los otros estudios se usó embriones de 1 y 3 días post fertilización (d.p.f). Mientras que en ensayos para estrés oxidativo solo en tres estudios se emplearon oxidantes, AAPH (dihidrocloreuro de 2,2'-azobis (2- amidinopropano) con (Boeri et al., 2020), sulfato de cobre con (Nguyen et al., 2020) y oxazolona con (Poornima et al., 2019).

Compuestos aislados de plantas

Si se cuenta con estudios de los compuestos de las plantas esto permite realizar posteriormente pruebas con un compuesto específico, eliminando interferencias y determinando con exactitud un determinado efecto, se revisaron doce artículos donde usaron uno o varios compuestos aislados de plantas, sin tratamiento o conversión, solo purificados.

Al ser compuestos ya conocidos se reduce la necesidad de analizar su estructura, por lo que solo cinco de ellos requirieron un estudio profundo de este tipo, (Kim et al., 2020) utilizó HCPCP (cromatografía de partición por centrifugación de alto rendimiento) y HPLC para analizar la (-)-loliolide que usó, (Xia et al., 2021) usó cromatografía con etanol para el metabolito, mientras (Rajasekar et al., 2019) fue el que más requirió de ensayos como solubilidad en distintos solventes polares y no polares, contenido de carbohidratos, proteínas, ácido uránico y caracterización estructural por espectrofotometría UV-vis (radiación ultravioleta-visible), (Roberto et al., 2021) usó ocho análisis químicos, entre los que resaltan actividad antioxidante por DPPH y ensayo de betacaroteno con cloroformo, por último, (Jayawardena et al., 2020) usó varias caracterizaciones como análisis de polifenoles, contenido de sulfatos, entre otros referentes a su investigación. (Cho et al., 2019) resaltó con un ensayo Western blot para anticuerpos ligados a la actividad inmunológica, estos fueron *anti-bax*, *anti-bcl-xL*, *anti-PARP*, *anti-cleaved caspase-9* *anti-phospho-NF-κB p105*, *anti-phospho-NF-κB p65*, *anti-rabbit IgG*.

En los ensayos in vivo, se usó peces de 7 a 9 h.p.f en los trabajos de (Cho et al., 2019; Jayawardena et al., 2020; Kim et al., 2020), mientras que, (Arteaga et al., 2021), empleo embriones entre 0 y 4 h.p.f así como otros autores (Issac et al., 2021; Kang, Kim, et al., 2013; Xia et al., 2021); por otro lado, se usó larvas de 6 d.p.f. en el trabajo de (Endo et al., 2020) debido a que requería peces que puedan soportar metabolitos fuertes frente al metabolismo animal, (Roberto et al., 2021) usó peces de 7 d.p.f mientras (Rajasekar et al., 2019), fue el que usó peces de mayor edad 15 d.p.f., principalmente porque el metabolito se suministró de forma oral mediante una mezcla en el alimento.

En los ensayos en peces se incluyó la apoptosis en seis de los once artículos, en todos se usó ensayos con tinción de naranja de acridina para la observación de células; la mortalidad se observó mediante microscopio óptico, haciendo una medición del ritmo cardíaco de los

en (Kim et al., 2020), siendo estos genes de actividad antioxidantes. La generación de radicales intracelulares fue evaluado mediante el método con DCF-DA en seis de los artículos que realizaron dicho ensayo, otro de los análisis más comunes fue la peroxidación lipídica en cinco de los doce artículos, de los cuales cuatro usaron el método con DPPH (1,3-bis (difenilfosfino) propano) y solo uno la reacción con TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances). (Issac et al., 2021) fue el que realizó pruebas más exhaustivas para analizar la presencia de enzimas que brindan protección antioxidante, estas fueron para superóxido dismutasa, catalasa, glutatión reducido, glutatión peroxidasa, glutatión-S- transferasa y acetilcolinesterasa. (Rajasekar et al., 2019) observó el crecimiento, reproducción y efecto en los tejidos, siendo un estudio de mayor tiempo que los otros llegando hasta los 60 d.p.f por las dosis administradas en el alimento.

Se usó como inductor de estrés oxidativo al peróxido de hidrógeno en cuatro estudios, AAPH en tres de ellos; arseniato de sodio, etanol y tert-butil hidroperóxido en una ocasión.

Compuestos químicos

La investigación no siempre se trata de encontrar nuevos compuestos, también se puede dar un nuevo uso a los ya existentes, generalmente esto se analiza mediante la observación de posibles efectos secundarios en tratamientos o por las propiedades del compuesto, se infiere que presentan capacidades antioxidantes y antiinflamatorias, por lo que se recurre a su comprobación.

Estos compuestos fueron adquiridos a distintas casas químicas para su utilización, al haber mayor diversidad en su estructura y composición, por lo que se obtuvo un mayor margen en análisis, tiempos y condiciones.

Ciertos compuestos requirieron análisis de su composición o pureza, se usó HPLC en los trabajos de (Carrillo et al., 2016; Jia et al., 2018; Jiao et al., 2020), no se usó otro método general para analizar factores que infieran en la actividad antioxidante, siendo uno de los pocos tratamientos que sobresalieron el de (Rangasamy et al., 2018), que midió la concentración de ketoprofeno en el agua de los peces posterior a la inoculación del compuesto.

Los tiempos a los que se aplicaron los compuestos a los peces cebras fueron distintos, los de menor aplicación fueron ketoprofeno y resveratrol con 3 h.p.f, seguido por lisozima con 48 h.p.f, entre 5 a 7 d.p.f con abamectina, polietilen tereftalato, fluralano y MeO-PEG-b-PMOT (metoxi-poli(etilenglicol)-b-poli(4- [2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil]oximetil estireno),

mientras que en los ensayos donde los peces tenían mayor edad se aplicó la ulexita con 14 d.p.f y vitamina E con 15 d.p.f, debido a que fue suministrada en la alimentación de los peces.

El agente para inducir estrés fue AAPH y peróxido de hidrógeno, solo en (Carrillo et al., 2016; Vong et al., 2016) mientras en los otros estudios no se reportó uso de agente oxidante.

Solo (Carrillo et al., 2016; Vong et al., 2016) (Boeri et al., 2020; Vong et al., 2016) reportaron mortalidad y dismorfogénesis mediante observación en microscopio, se reportó apoptosis en (Ren et al., 2020) mediante naranja de acridina, y (Jiao et al., 2020) mediante el Kit Jiancheng Nanjing. (Alak et al., 2021; Boeri et al., 2020; dos Santos et al., 2020) usaron el método con TBARS para peroxidación oxidativa, mientras (Rangasamy et al., 2018) usó fijación en placa y observación en microscopio para este fin.

Se evaluó la expresión de genes relacionados con la actividad antioxidante en los peces, mediante PCR en tiempo real, los genes que se buscó fueron *cyp1a*, *vtg*, y *β-actin*, *sod*, *cat*, *gpx*, *Nrf2*, *ho-1*, *nt10b*, *GSK-3β*, *PPARγ*, *β-catenin*, *gapdh* y *elfa*, estos análisis se realizaron en cinco de los estudios.

Se observó el uso de kits de Nanjing Jiancheng para evaluar la actividad de enzimas relacionadas a la capacidad antioxidante de los peces, basados en los siguientes principios:

Catalasa: espectroscopía del consumo de peróxido de hidrógeno

Superóxido dismutasa: formación de adenocromo por espectroscopía

Glutación peroxidasa: espectroscopía de la oxidación de NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato)

Glutación de s-transferasa: espectroscopia de la reducción de glutación por CDNB (2,4-dinitroclorobenceno)

Estos análisis se realizaron en ocho de los artículos de esta sección, además de otros específicos.

Otras fuentes

Si bien, las principales fuentes son las vegetales y sus derivados, se opta por técnicas novedosas para lograr efectos antioxidantes, una de ellas es la modificación genética para expresar genes que promueven la defensa contra agentes estresantes, como con el trabajo (Sant et al., 2018) que insertó el gen *Nrf2a* y posterior se analizó su expresión mediante

PCR, la mortalidad con observación mediante microscopio y la apoptosis con el método de naranja de acridina, también se realizó análisis *in vitro* como HPLC.

Las fuentes animales no son conocidas por producir antioxidantes ni antiinflamatorios, pero ciertas enzimas pueden ayudar a estos propósitos, como en el trabajo con lisozima de huevo de gallina realizado por (Carrillo et al., 2016), donde se aísla esta enzima y se proporciona al pez cebra a los 48 h.p.f, al ser una experiencia con pocos antecedentes se procedió a realizar varias concentraciones para identificar el comportamiento con este compuesto, además se realiza un HPLC y espectroscopía de masa para la composición de la sustancia administrada, se usó observación por microscopio para dimorfogénesis y mortalidad, mientras que el método TBARS para peroxidación lipídica en los peces, siendo estos métodos que se han visto en otras experiencias.

Además de propiedades antioxidantes, los metabolitos pueden proporcionar otros beneficios, siendo versátiles en su implementación, tal es el caso de los probióticos de liofilizado de *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium longum*, fueron suministrados en alimentos por 12 días, como se observó en otras experiencias con la misma forma de dosificación, los tiempos de exposición son elevados, se observó el comportamiento mediante fotografías y su movilidad, (Valcarce et al., 2019) hizo énfasis en la calidad de esperma para su posterior uso en reproducción, indicando lo polifacético que resultan los metabolitos.

Conclusiones

El pez cebra es un excelente modelo para el estudio de distintos tipos de metabolitos, como se observó se puede usar tanto para análisis preliminares de extractos, o de compuesto naturales y químicos ya aislados, incluso se llega a emplear ingeniería genética. El potencial de este modelo se ve en el efecto antioxidante y antiinflamatorio que se puede inducir fácilmente empleando agentes inductores, gracias a su rápido crecimiento y posible estudio en etapas tempranas de desarrollo (desde 1 h.p.f), además de sus características físicas como su piel transparente, lo que permite observar mediante microscopía el interior de estos animales y así observar efectos en sus órganos y desarrollo. La similitud del genoma con los humanos ha permitido que se analice mediante PCR varios genes relacionados a la capacidad antioxidante y antiinflamatoria, además de la expresión mediante Western blot de estos genes, para complementar los estudios *in vivo*, se desarrollan varios análisis químicos y de caracterización, como HPLC, DPPH, espectroscopía de masa, absorbancia, etc., permitiendo conocer el metabolito en su estructura y grupos funcionales. EL modelo

de pez cebra es de fácil manipulación y de costes moderados para su implementación, por lo que no requieren grandes espacios para su estudio; para el análisis de tejidos su eutanasia se realiza con anestesia y se homogeniza sus tejidos, con esto los ensayos enzimáticos se realizan sin inconvenientes, además que los tejidos se pueden conservar para otros análisis. La adaptabilidad del pez cebra a distintos metabolitos, la facilidad de manejo y la cercanía a los seres humanos en el genoma lo hace un candidato ideal para usarlo como modelo para análisis preclínicos de medicamentos y nuevos metabolitos.

Bibliografía

Acevedo Fernández, J. J., Angeles Chimal, J. S., Rivera, H. M., Petricevich López, V. L., Nolasco Quintana, N. Y., Collí Magaña, D. Y., & Santa-Olalla Tapia, J. (2013). Modelos in vitro para la evaluación y caracterización de péptidos bioactivos. In *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias* (pp. 29–82). OmniaScience. <https://doi.org/10.3926/oms.38>

Alak, G., Ucar, A., Parlak, V., Yeltekin, A. Ç., Özgeriş, F. B., Atamanalp, M., & Türkez, H. (2021). Antioxidant Potential of Ulexite in Zebrafish Brain: Assessment of Oxidative DNA Damage, Apoptosis, and Response of Antioxidant Defense System. *Biological Trace Element Research*, 199(3), 1092–1099. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02231-7>

Armas, D. (2016). 2016 Artículo Plantas Ciencia Unemi Echavarría 344-992-1-PB. 9, 29–35.

Arteaga, C., Boix, N., Teixido, E., Marizande, F., Cadena, S., & Bustillos, A. (2021). The zebrafish embryo as a model to test protective effects of food antioxidant compounds. *Molecules*, 26(19). <https://doi.org/10.3390/molecules26195786>

Arteaga, C., Bustillos, A., & Gómez-Catalán, J. (2020). Migración de neutrófilos en larvas de pez cebra expuestas a extractos de sofrito de tomate. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 70(3), 182–190. <https://doi.org/10.37527/2020.70.3.004>

Boeri, P., Piñuel, L., Dalzotto, D., Monasterio, R., Fontana, A., Sharry, S., Barrio, D. A., & Carrillo, W. (2020). Argentine Patagonia barberry chemical composition and evaluation of its antioxidant capacity. *Journal of Food Biochemistry*, 44(7), 1–11. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13254>

Camacho-Escobar, M. A., Ramos-Ramos, D. A., Ávila-Serrano, N. Y., Sánchez-Bernal, E. I., & López- Garrido, S. J. (2020). The physico-chemical plant defenses and its effect on ruminant feeding. *Terra Latinoamericana*, 38(2), 443–453. <https://doi.org/10.28940/TERRA.V38I2.629>

Camacho-Romero, O. I., Melgarejo-Gómez, S., & De-la-Rosa-Torres, C. (2017). Extracción y evaluación de los metabolitos secundarios de extractos etéreos del fruto *Syzygium cumini* (Jambol). *Revista Tecnología En Marcha*, 30(1), 113. <https://doi.org/10.18845/tm.v30i1.3090>

Carrillo, W., Gómez-Ruiz, J. A., Miralles, B., Ramos, M., Barrio, D., & Recio, I. (2016). Identification of antioxidant peptides of hen egg-white lysozyme and evaluation of inhibition of lipid peroxidation and cytotoxicity in the Zebrafish model. *European Food Research and Technology*, 242(10), 1777–1785. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2677-1>

Castro, G. D. (2013). Dependencia de la dosis en los mecanismos de toxicidad y la evaluación de riesgo en toxicología. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 47(3), 561–585.

Cho, S. H., Heo, S. J., Yang, H. W., Ko, E. Y., Jung, M. S., Cha, S. H., Ahn, G., Jeon, Y. J., & Kim, K. N. (2019). Protective effect of 3-Bromo-4,5-dihydroxybenzaldehyde from polysiphonia *morrowii* harvey against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in Vitro and in Vivo. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(8), 1193–1203. <https://doi.org/10.4014/JMB.1904.04062>

Cholan, P. M., Han, A., Woodie, B. R., Watchon, M., Kurz, A. R. M., Laird, A. S., Britton, W. J., Ye, L., Holmes, Z. C., McCann, J. R., David, L. A., Rawls, J. F., & Oehlers, S. H. (2020). Conserved anti-inflammatory effects and sensing of butyrate in zebrafish. *Gut Microbes*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1824563>

dos Santos, M. M., de Macedo, G. T., Prestes, A. S., Ecker, A., Müller, T. E.,
Leitemperger, J., Fontana, B.

D., Ardisson-Araújo, D. M. P., Rosemberg, D. B., & Barbosa, N. V. (2020). Modulation of redox and insulin signaling underlie the anti-hyperglycemic and antioxidant effects of diphenyl diselenide in zebrafish. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 158). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.06.002>

Endo, Y., Muraki, K., Fuse, Y., & Kobayashi, M. (2020). Evaluation of antioxidant activity of spice-derived phytochemicals using zebrafish. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3). <https://doi.org/10.3390/ijms21031109>

Escobedo-Moratilla, Abraham; Barba de la Rosa, Ana Paulina; Pérez-Urizar, J. (2015). Modelos preclínicos in vitro e in vivo para la evaluación de la actividad biológica en estudios de biocomparabilidad. *Gaceta Médica de México*, 151, 377–386.

Espinosa, M. B. (2016). El Pez Cebra: una herramienta en educación The Zebrafish : A Tool in Education Resumen Introducción. *Revista de Educación En Biología*, 19(1), 11–18.

Fina, B. L., Lombarte, M., & Rigalli, A. (2013). Research a natural phenomenon: Studies in vivo, in vitro or in silico? | Investigación de un fenómeno natural: Estudios in vivo, in vitro o in silico? *Actualizaciones En Osteología*, 9(3), 294–299.

Hanachi, P., Kazemi, S., Zivary, S., Karbalaeei, S., & Abolghasem Ghadami, S. (2021). The effect of polyethylene terephthalate and abamectin on oxidative damages and expression of vtg and cyp1a genes in juvenile zebrafish. *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*, 16(April), 100565. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2021.100565>

Issac, P. K., Guru, A., Velayutham, M., Pachaiappan, R., Arasu, M. V., Al-Dhabi, N. A., Choi, K. C.,

Harikrishnan, R., & Arockiaraj, J. (2021). Oxidative stress induced antioxidant and neurotoxicity demonstrated in vivo zebrafish embryo or larval model and their normalization due to morin showing therapeutic implications. *Life Sciences*, 283(May), 119864. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119864>

Jayawardena, T. U., Wang, L., Asanka Sanjeewa, K. K., In Kang, S., Lee, J. S., & Jeon, Y. J. (2020).

Antioxidant potential of sulfated polysaccharides from padina boryana; protective effect against oxidative stress in in vitro and in vivo zebrafish model. *Marine Drugs*, 18(4), 1–14. <https://doi.org/10.3390/md18040212>

Jia, Z. Q., Liu, D., Sheng, C. W., Casida, J. E., Wang, C., Song, P. P., Chen, Y. M., Han, Z. J., & Zhao, C.

Q. (2018). Acute toxicity, bioconcentration, elimination and antioxidant effects of fluralaner in zebrafish, *Danio rerio*. *Environmental Pollution*, 232, 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.032>

Jiao, Y., Tao, Y., Yang, Y., Diogene, T., Yu, H., He, Z., Han, W., Chen, Z., Wu, P., & Zhang, Y. (2020).

Monobutyl phthalate (MBP) can dysregulate the antioxidant system and induce apoptosis of zebrafish liver. *Environmental Pollution*, 257, 113517. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113517>

Kang, M. C., Cha, S. H., Wijesinghe, W. A. J. P., Kang, S. M., Lee, S. H., Kim, E. A., Song, C. B., & Jeon, Y. J. (2013). Protective effect of marine algae phlorotannins against AAPH-induced oxidative stress in zebrafish embryo. *Food Chemistry*, 138(2–3), 950–955. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.005>

Kang, M. C., Kim, K. N., Kang, S. M., Yang, X., Kim, E. A., Song, C. B., Nah, J. W., Jang, M. K., Lee, J.

S., Jung, W. K., & Jeon, Y. J. (2013). Protective effect of dieckol isolated from *Ecklonia cava* against ethanol caused damage in vitro and in zebrafish model. *Environmental*

Toxicology and Pharmacology, 36(3), 1217–1226.
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.09.018>

Kettleborough, R. N. W., Busch-Nentwich, E. M., Harvey, S. A., Dooley, C. M., de Bruijn, E., van Eeden, F., Sealy, I., White, R. J., Herd, C., Nijman, I. J., Fényes, F., Mehroke, S., Scahill, C., Gibbons, R., Wali, N., Carruthers, S., Hall, A., Yen, J., Cuppen, E., & Stemple, D. L. (2013). A systematic genome-wide analysis of zebrafish protein-coding gene function. *Nature*, 496(7446), 494–497. <https://doi.org/10.1038/nature11992>

Kim, H. S., Wang, L., Fernando, I. P. S., Je, J. G., Ko, S. C., Kang, M. C., Lee, J. M., Yim, M. J., Jeon, Y.

J., & Lee, D. S. (2020). Antioxidant efficacy of (–)-loliolide isolated from *Sargassum horneri* against AAPH-induced oxidative damage in Vero cells and zebrafish models in vivo. *Journal of Applied Phycology*, 32(5), 3341–3348. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02154-9>

Lawrence, C. (2007). The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, 269(1–4), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.077>

Liu, D., Yu, H., & Zhang, Q. (2020). Dietary vitamin e regulates the activity of antioxidant enzymes through Wnt10b signaling in the muscle of zebrafish. *Food and Function*, 11(12), 10665–10674. <https://doi.org/10.1039/d0fo02083d>

Moctezuma Viera, K. R. (2020). Utilización de animales en la investigación biomédica y médica. *Revista Iberoamericana de Bioética*, 12, 01–19. <https://doi.org/10.14422/rib.i12.y2020.011>

Mohamad Shariff, N. F. S., Singgampalam, T., Ng, C. H., & Kue, C. S. (2020). Antioxidant activity and zebrafish teratogenicity of hydroalcoholic *Moringa oleifera* L. leaf extracts. *British Food Journal*, 122(10), 3129–3137. <https://doi.org/10.1108/BFJ-02-2020-0113>

Nguyen, T. H., Le, H. D., Kim, T. N. T., The, H. P., Nguyen, T. M., Cornet, V., Lambert, J., & Kestemont, P. (2020). Anti-inflammatory and antioxidant properties of the ethanol extract of *Clerodendrum cyrtophyllum turcz* in copper sulfate-induced inflammation in zebrafish. *Antioxidants*, 9(3), 1–20. <https://doi.org/10.3390/antiox9030192>

Perumal, S., Gopal Samy, M. V., & Subramanian, D. (2021). Developmental toxicity, antioxidant, and marker enzyme assessment of swertiamarin in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 35(9). <https://doi.org/10.1002/jbt.22843>

Poornima, S., Nagarjun, N., Ponmurugan, P., Gnanamangai, B. M., & Narasimman, S. (2019). Toxicity and anti-inflammatory study of *Parmotrema austrosinense* extract against oxozone induced intestinal inflammation in zebrafish (*Danio rerio*) model. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21, 101278. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101278>

Pradeep, P. S., Manisha, S., Monica Amala Nayaki, J., Sivaraman, D., Selvaraj, R., & Seeni, S. (2019). Potential antioxidant and anti-inflammatory action of *Hypericum hookerianum* extracts in a liposome system evaluated with zebrafish embryos. *Journal of Microencapsulation*, 36(6), 513–522. <https://doi.org/10.1080/02652048.2019.1631400>

Rajasekar, P., Palanisamy, S., Anjali, R., Vinosha, M., Elakkiya, M., Marudhupandi, T., Tabarsa, M., You, S. G., & Prabhu, N. M. (2019). Isolation and structural characterization of sulfated polysaccharide from *Spirulina platensis* and its bioactive potential: In vitro antioxidant, antibacterial activity and Zebrafish growth and reproductive performance. *International Journal of Biological Macromolecules*, 141, 809–821. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.024>

Rangasamy, B., Hemalatha, D., Shobana, C., Nataraj, B., & Ramesh, M. (2018). Developmental toxicity and biological responses of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to anti-inflammatory drug ketoprofen. In *Chemosphere* (Vol. 213). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.013>

Ren, F., Huang, Y., Tao, Y., Ji, C., Aniagu, S., Jiang, Y., & Chen, T. (2020). Resveratrol protects against PM2.5-induced heart defects in zebrafish embryos as an antioxidant rather than as an AHR antagonist. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 398, 115029. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115029>

Roberto, V. P., Surget, G., Le Lann, K., Mira, S., Tarasco, M., Guérard, F., Poupart, N., Laizé, V., Stiger-Pouvreau, V., & Cancela, M. L. (2021). Antioxidant, Mineralogenic

and Osteogenic Activities of *Spartina alterniflora* and *Salicornia fragilis* Extracts Rich in Polyphenols. *Frontiers in Nutrition*, 8(August), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.719438>

Saeidnia, S., Manayi, A., & Abdollahi, M. (2016). From in vitro Experiments to in vivo and Clinical Studies; Pros and Cons. *Current Drug Discovery Technologies*, 12(4), 218–224. <https://doi.org/10.2174/1570163813666160114093140>

Sant, K. E., Sinno, P. P., Jacobs, H. M., & Timme-Laragy, A. R. (2018). Nrf2a modulates the embryonic antioxidant response to perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) in the zebrafish, *Danio rerio*. *Aquatic Toxicology*, 198, 92–102. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.02.010>

Udaya, S., Babu, N., Nanjappa, D. P., Kalladka, K., Chakraborty, G., & Chakraborty, A. (2020). Evaluation of Toxicity and Antioxidant Property of *Cassia fistula* Stem Bark Extracts in Zebrafish. *Journal of Health and Allied Sciences NU*, 10(3), 109–115. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1715995>

Valcarce, D. G., Riesco, M. F., Martínez-Vázquez, J. M., & Robles, V. (2019). Diet supplemented with antioxidant and anti-inflammatory probiotics improves sperm quality after only one spermatogenic cycle in zebrafish model. *Nutrients*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/nu11040843>

Vong, L. B., Kobayashi, M., & Nagasaki, Y. (2016). Evaluation of the toxicity and antioxidant activity of redox nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. In *Molecular Pharmaceutics* (Vol. 13, Issue 9). <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00225>

Wang, W., & Liu, J. (2020). Efficient extraction, antioxidant activities and anti-inflammation of polysaccharides from *Notopterygium franchetii* Boiss. *Carbohydrate Polymers*, 248, 116783. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116783>

White, R. M., Sessa, A., Burke, C., Bowman, T., LeBlanc, J., Ceol, C., Bourque, C., Dovey, M., Goessling, W., Burns, C. E., & Zon, L. I. (2008). Transparent Adult Zebrafish as a Tool for In Vivo Transplantation Analysis. *Cell Stem Cell*, 2(2), 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.11.002>

Xia, G., Li, X., Zhang, Z., & Jiang, Y. (2021). Effect of food processing on the antioxidant activity of flavones from *Polygonatum odoratum* (Mill.) Druce. *Open Life Sciences*, 16(1), 92–101. <https://doi.org/10.1515/biol-2021-0010>