

Trabajo Original

Toxicología Experimental

Toxicidad de los Aminoglicosidos (AGs) sobre el tejido óseo craneofacial de larvas de pez cebra *Danio rerio*.

Álvarez M., ¹ Rivas J., Perdomo L., Navarro E., Arias M., Hernández C.

Sección de Microscopia, Instituto Anatómico "José Izquierdo", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela, 01053.

Correspondencia:¹ alvarezmenator@gmail.com

Resumen

Los Aminoglicósidos, AG, son un grupo de antibióticos ampliamente conocidos por su acción bactericida y tóxica, cuyo efecto sobre el tejido óseo hasta el momento, ha sido poco estudiado. La investigación tuvo como objetivo evaluar la toxicidad inducida por Netilmicina, Gentamicina y Amikacina, así como la posible acción osteotóxica vinculada con los mismos, en el modelo larvario de pez cebra *Danio rerio*. Poblaciones larvarias de 5 días post-fertilización, fueron seleccionadas al azar y tratadas con concentraciones conocidas de AGs, durante 24, 48 y 72 horas, respectivamente. Se determinó la letalidad de cada AGs, expresada como porcentaje de mortalidad en función de la concentración y tiempo de exposición. Adicionalmente, se describieron los cambios morfo-funcionales inducidos por la Concentración Tóxica Cincuenta, CT₅₀. Posteriormente, la población de larvas, control y tratadas con CT₅₀, fueron coloreadas con Rojo de Alizarina (RA) para establecer, a través de cambios en la intensidad de la fluorescencia del colorante, la posible acción de los AGs sobre el sistema óseo. Los AGs, presentaron una acción tóxica progresiva dependiente de la concentración y el tiempo de exposición. La torsión troncal resultó predominante con el uso de Netilmicina y Gentamicina, mientras que la presencia de coágulos a nivel cardíaco, la fue para Amikacina. Los elementos óseos del esqueleto craneofacial de las larvas tratadas, mostraron una reducción en la intensidad del marcaje con RA, con cambios en el histograma de densidad, en comparación con los controles. Los resultados sugieren un daño sobre los elementos óseos que conforman el esqueleto craneofacial de las larvas, posiblemente vinculado con un proceso de desmineralización promovido por estos AGs. Dichos resultados abren un camino hacia la inclusión de la acción osteotóxica, como un severo daño a considerar, durante la aplicación de estos antibióticos.

Palabras claves: Aminoglicósidos, antibióticos, osteotóxicidad, rojo de alizarina, desmineralización, pez cebra *Danio rerio*.

Summary

AMINOGLYCOSIDES (GAs) TOXICITY ON CRANIOFACIAL BONE TISSUE

OFLARVAL ZEBRAFISH *Danio rerio*.

Aminoglycosides (GAs) are a group of antibiotics known for their bactericidal and toxic action, whose effect on bone tissue so far, has been rarely studied. The aim of this research was to evaluate the toxicity induced by the Netilmicine, Gentamicin and Amikacin, as well as the possible osteotoxicity action associated with them, within the larval Zebrafish *Danio rerio* model. Larval populations of 5 days post-fertilization were randomly selected and treated with known concentrations of GAs for 24, 48 and 72 hours, respectively. Lethality of each GAs was determined in terms of percentage of mortality as a function depending of the concentration and time exposure. Additionally, the morpho-functional changes induced by toxic the concentration fifty (TC50) were described. The population of larvae, control group and treated with TC50, were stained with Alizarin Red (RA) in order to establish, through changes in the fluorescence intensity of the dye, the possible action of GAs on the skeletal system. GAs presented a progressive differential toxic action, depending on the concentration and exposure time. The backbone torsion turned out to be predominant when using Netilmicin and Gentamicin, as did the presence of clots at the cardiac level when using Amikacin. Bone elements of the craniofacial skeleton of treated larvae of Zebrafish *Danio rerio*, showed a reduction in the intensity of RA staining, with changes in the density histogram, in comparison to controls. The results suggest possible damage of bone elements of the craniofacial skeleton of the larvae, possibly linked with a demineralization process promoted by these GAs. These results open a path to the addition of osteotoxicity action as another source of severe damage to be considered during the application of these antibiotics.

Keywords: Aminoglycosides, antibiotics, osteotoxicity, alizarin red, demineralization, Zebrafish *Danio rerio*.

Introducción

Aminoglicósidos (AGs), como la Netilmicina, Gentamicina y Amikacina, son un grupo de antibióticos comúnmente prescritos para tratar infecciones bacterianas Gram – negativas.¹Aunque no son un tratamiento de primera línea, estos AGs no han dejado de ser utilizados, pese a que se ha demostrado que su aplicación causa severas complicaciones en las células ciliadas sensoriales de los seres humanos y otros mamíferos.²Su acción ototóxica, nefrotóxica así como su acción bloqueante de la unión neuromuscular, han sido reportadas,^{3, 4}sin descartar su posible acción sobre el sistema óseo, respecto al cual, hasta los momentos, son pocas y no muy claras las evidencias experimentales que así lo hayan reportado. En los últimos años, el pez cebra *Danio rerio*, ha sido definido como un modelo versátil y eficiente para el estudio del sistema óseo de vertebrados, debido a la similitud que presenta con los humanos en lo que respecta a la estructura del cartílago y el hueso.^{5, 6} Particularmente, el esqueleto craneofacial de larvas de pez cebra ha sido ampliamente descrito en estudios anatómicos,^{7,8}encontrándose que la región craneofacial de las larvas está formado por un conjunto de huesos endocondrales e intramembranosos, que en conjunto van a constituir el esqueleto faríngeo, el neurocráneo y el dermatocráneo en el pez.⁹Como en la mayoría de los peces teleosteos, el esqueleto faríngeo está conformado por una serie de arcos bien definidos; entre los que destacan, el arco mandibular, el arco hioideo y los arcos branquiales, que han sido visualizados con el uso de tinciones clásicas como la del Rojo de Alizarina.¹⁰Dicho marcaje, ha sido de gran utilidad para la identificación de los centros de osificación de la mano y la región cefálica.^{11,12}En el pez cebra, los centros de osificación han sido descritos a nivel del esqueleto faríngeo, en donde se desarrollan y crecen a partir de cartílagos durante la embriogénesis tardía, hasta ser subsecuentemente reemplazado por hueso a los 5 días postfecundación.¹³Estos sitios constituyen el origen de los tejidos densos del hueso del esqueleto de los vertebrados. Entender esta base anatómica del esqueleto craneofacial en el estadio larvario del pez cebra, hace posible evaluar la acción de agentes xenobióticos de importancia terapéutica, por lo que en el presente trabajo se propuso evaluar la acción de AGs, tales como la Netilmicina, la Gentamicina y la Amikacina, así como la posible osteotóxicidad vinculada con los mismos, en el modelo larvario de pez cebra *Danio rerio*.

Materiales y Métodos

Mantenimiento de los peces y producción de larvas de pez cebra *Danio rerio*

Peces adultos de *Danio rerio*, tipo silvestre (wt) fueron mantenidos en acuarios en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Instituto Anatómico "José Izquierdo" de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela, bajo condiciones controladas de luz, temperatura y propiedades fisicoquímicas del agua, entre otras. ¹⁴La población larvaria utilizada en la presente investigación fueron obtenidas a partir de peces cebra adultos machos y hembras, estimulados a través de ciclos de luz-oscuridad de 10 horas y 14 horas, respectivamente, con la finalidad de inducir un apareamiento y desove natural. ¹⁵Los huevos fertilizados fueron aislados, seleccionados y mantenidos a temperatura ambiente en placas de Petri con agua de pecera filtrada, hasta alcanzar un estadio larvario de 5 días postfertilización (dpf).

Bioensayo de toxicidad

Para los ensayos de toxicidad, se expusieron por duplicado 10 larvas de pez cebra de 5 dpf, por pozo, en placas de 24 pozos, a diferentes soluciones de Netilmicina, Gentamicina y Amikacina que contenían 15, 30 y 60 µg/mL de los respectivos AGs. Las soluciones fueron preparadas a partir de antibióticos comerciales en presentación de discos hidrosolubles de concentraciones conocidas, siendo estas de 30 µg para Netilmicina y Amikacina, y 10 µg para Gentamicina. Luego de 24, 48 y 72 horas (h) de exposición, se determinó el número de larvas muertas por concentración y se describieron los cambios morfológicos observados mediante el microscopio estereoscópico. Los datos de muerte larvaria fueron expresados como porcentaje (%) de mortalidad para cada AGs y posteriormente graficados mediante el programa GraphPad Prism V.6. Los registros de mortalidad en función de la concentración de AGs nos permitieron determinar la Concentración Letal Cincuenta (CL₅₀) ± la Desviación Estándar (DE) a las 48 h de exposición, a través del Método Estadístico de Spearman-Kärber. ¹⁶A partir de dicha estimación, fue posible obtener el rango de concentración subletal CL₅₀⁽⁻⁾, considerada en nuestra investigación como la CL₅₀-DE, con un valor de confianza del 95%. Una vez calculada la CL₅₀⁽⁻⁾, larvas de 5 dpf fueron tratadas con dicha concentración durante 48 horas, luego de lo cual fueron incubadas con una solución de Rojo de Alizarina al 0.5% durante 24 horas a temperatura ambiente y en oscuridad, ¹⁷con la finalidad de evidenciar los efectos de la CL₅₀⁽⁻⁾ sobre el esqueleto craneofacial de las larvas de pez cebra. Posteriormente, las muestras fueron lavadas y fijadas sobre un soporte de agarosa al 2% (Sigma Ha-9915) para luego ser observadas bajo el microscopio de fluorescencia Olympus IX71, a una longitud de onda de excitación entre 535 y 555 nm.

Resultados

Los resultados obtenidos muestran que los AGs tiene un efecto tóxico sobre larvas de pez cebra *Danio rerio*, evidenciado por un comportamiento diferencial en lo que respecta a la inducción de muerte en la población larvaria tratada. En el caso de la Netilmicina (Fig. 1), se obtuvo una mortalidad progresiva temporal en la cual altas dosis del AGs y largos tiempo de exposición provocan un incremento en el % de mortalidad de la población larvaria tratada. Se puede apreciar que a las 72 h de tratamiento hay una respuesta lineal donde se alcanza un 100% de mortalidad independientemente de la concentración de AG, a diferencia de las 24 y 48 h, donde se puede apreciar que ocurre un aumento progresivo de la mortalidad dependiendo de la concentración (Fig. 1a). Por su parte, la población larvaria sobreviviente a la CL_{50} , estimada a las 48 h en un valor de $41,49 \pm 8,67 \mu\text{g/ml}$, presento una $CL_{50}^{(-)}$ de $32,82 \mu\text{g/ml}$. El análisis morfológico (Fig. 1b), demostró cambios morfológicos predominantes a las 48 h, caracterizados en su mayoría por curvatura troncal en 50% de la población larvaria, así como necrosis a las 72 h, mientras que a las 24 h se observaron características morfológicas similares a la de los controles. En el caso de la Gentamicina, se registró una mortalidad progresiva dependiente de la concentración y el tiempo de exposición, incluyendo a las 72 h de tratamiento. La población larvaria sobreviviente a la CL_{50} , estimada a las 48 h en un valor de $41,03 \pm 7,80 \mu\text{g/ml}$, presento una $CL_{50}^{(-)}$ de $33,23 \mu\text{g/ml}$. Los cambios morfológicos observados a las 24, 48 y 72 h fueron similares a los registrados con la Netilmicina, es decir, a las 24 h de tratamiento parte de la población larvaria presento características morfológicas similares a los controles, mientras que a las 48 h el efecto predominante en el 50% de la población fue la curvatura troncal pronunciada así como la necrosis a las 72 h (Fig. 2b). En cuanto a la Amikacina, se registró de manera similar una mortalidad progresiva siendo bastante evidente a mayores concentraciones, específicamente a las 48 y 72 h de exposición (Fig. 3a). La población larvaria sobreviviente a la CL_{50} , estimada a las 48 h en un valor de $45,00 \pm 13,05 \mu\text{g/ml}$, presento una $CL_{50}^{(-)}$ de $31,95 \mu\text{g/ml}$. Al realizar el análisis morfológico se pudo apreciar cambios morfológicos evidentes a las 24, 48 y 72 h de tratamiento, caracterizados en su mayoría por la presencia de coágulos sanguíneos a nivel del área cardiaca, curvatura troncal en menor proporción y necrosis, respectivamente (Fig. 3b). Por su parte, la tinción con el Rojo de Alizarina nos revelo una posible acción toxica de Netilmicina, Gentamicina y Amikacina sobre el sistema óseo de las larvas de pez cebra tratadas en comparación con el control, que se pudo evidenciar por una diferencias en la intensidad y en la cantidad de estructuras del esqueleto craneofacial marcadas con la sonda fluorescente, la cual tiene la capacidad de unirse específicamente a las moléculas de calcio presentes en los elementos óseos de las estructuras esqueléticas.¹⁸ En todos los casos se produjo una reducción en la intensidad de la fluorescencia, la cual se ejemplifica con el caso de la Gentamicina (Fig. 4), en

donde el efecto de curvatura troncal fue mucho más pronunciado. En este sentido, al comparar morfológicamente las larvas control (Fig. 4a) con las tratadas (Fig. 4b), se puede apreciar una menor cantidad de estructuras óseas marcadas así como una menor intensidad en el marcaje en las regiones correspondientes al arco mandibular (a), el segundo arco hioides (b) y el tercer arco ceratobranquial (c). A mayor detalle se resalta esta última región en las larvas control (Fig. 4a') y tratadas (Fig. 4b'). El análisis semicuantitativo con histogramas de densidad, nos permitió resaltar dicha diferencia debido a las variaciones que se registraron entre larvas control (Fig. 4a'') y tratadas (Fig. 4b'').

Discusión

Los resultados obtenidos en la presente investigación permitieron demostrar, por una parte, la acción tóxica diferencial promovida por los AGs ensayados, en el modelo larvario de pez cebra *Danio rerio*, como un proceso dependiente de la concentración y del tiempo de exposición. Por otra parte, permitió inferir sobre la posible osteotóxicidad vinculada con los mismos. Los resultados obtenidos corresponden con los trabajos por otros autores,¹⁹ quienes haciendo uso del modelo larvario del pez cebra han logrado evaluar la toxicidad de una serie de antibióticos con diferentes polaridades. Con respecto a la acción tóxica de los AGs, cabe destacar, que la relación concentración–respuesta analizada a través del estudio de la correlación entre la mortalidad de los individuos expuestos y las diferentes concentraciones ensayadas, permitió predecir una toxicidad diferencial temporal asociada a cada uno de los AGs estudiados. Estos resultados *in vivo*, concuerdan con los resultados obtenidos *in vitro* por otros autores,²⁰ quienes empleando altas concentraciones de Gentamicina han logrado inducir la muerte de células aisladas tipo osteoblastos, características del tejido óseo. De igual forma, aplicando hidracidas sobre líneas celulares de osteosarcoma humano, han obtenido una disminución significativa en la población de osteoblastos, como efecto dependiente de la concentración.²¹ El análisis de esta correlación *in vivo* e *in vitro*, permite definir la muerte larvaria como un efecto letal agudo inducido por los AGs, que es dependiente del tiempo de exposición el cual encontró su óptima expresión probabilística a las 48 horas, así como de la concentración. Adicionalmente, resulto interesante, que dicho efecto letal se expresara dependiendo del AGs ensayado. Así, de acuerdo a los resultados obtenidos, tanto la Netilmicina como la Amikacina, fueron mucho más propensos de promover la necrosis a las 72 horas, a diferencia de como se pudo apreciar en las larvas tratadas con Gentamicina. En cuanto a la estructura anatómica, la aparición de curvatura troncal, resulto mucho más evidente en aquellas poblaciones tratadas con Netilmicina y Gentamicina, mientras que las de Amikacina resultaron en su mayor proporción

afectadas con daño a nivel cardiaco. En cuanto a la osteotóxicidad vinculada con los AGs ensayados, cabe destacar que esta acción quedó demostrada a través de una contundente disrupción de la porción craneofacial de las larvas tratadas, ejemplificadas con el uso de Gentamicina. Dicha acción, posiblemente está vinculada con la activación de un proceso de desmineralización debido a la pérdida de depósitos de calcio o alteraciones de la matriz extracelular calcificada, presente en el tejido que conforman los núcleos de osificación en la línea ontogénica que da lugar al hueso o la estructura ósea. Como resulta evidente, la osteotóxicidad reportada en la presente investigación, podría ser entendida como la activación de un proceso de desmineralización por parte de los AGs, quedando definida como una respuesta osteotóxica inducida por estos AGs. Respuestas similares han sido reportadas por otros autores,²² quienes haciendo uso de glucocorticoides de uso común durante largo periodo de tiempo, han registrado daño y malformaciones a nivel de las estructuras óseas de las escamas de adultos de pez *Danio rerio*, así como reducción en el proceso de mineralización de la matriz extracelular de estas estructuras, sugiriendo que a partir de este modelo es posible evaluar el proceso de remodelación y mineralización ósea. La deformación craneofacial reportada en la presente investigación corresponde a las descritas por numerosos autores en estudios similares.^{23, 24} Hasta el presente, poco se conoce sobre los mecanismos vinculados con dicho proceso de osteotóxicidad y menos del proceso de desmineralización inducida por AGs. Sin embargo, la activación de rutas oxidativas ha sido reportada.²⁵ Si en la presente investigación la desmineralización, sugerida como una acción osteotóxica inducida por los AGs se encuentra mediada por rutas oxidativas, no ha sido posible establecerlo de manera contundente, queda por tanto continuar indagando sobre las posibles vías a través de las cuales se rige la osteotóxicidad vinculada con los AGs, Netilmicina, Gentamicina y Amikacina.

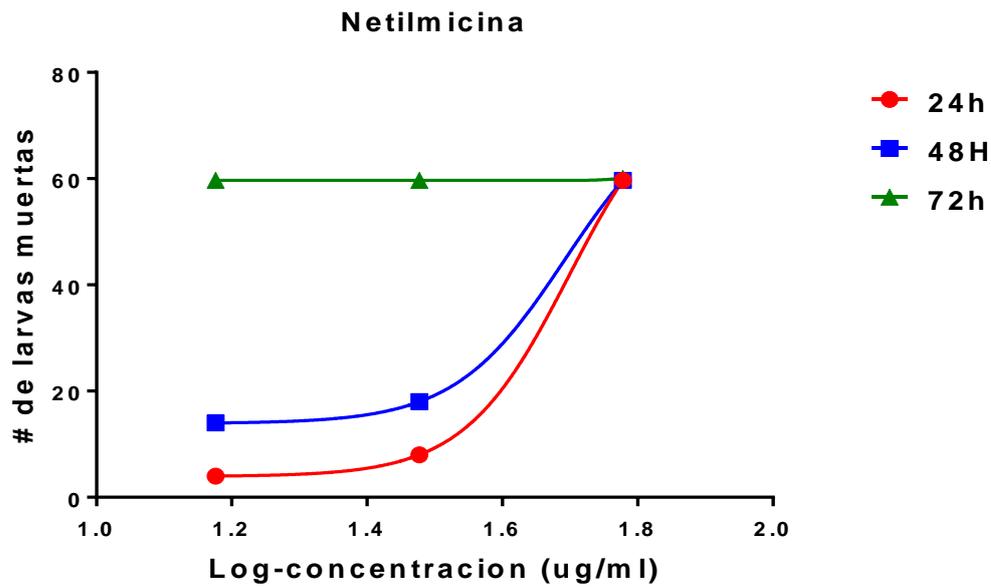


Fig.1a. Netilmicina induce mortalidad concentración-tiempo dependiente. Cada punto corresponde al valor promedio de 3 experimentos realizados por triplicado con un n=30 larvas por punto .

NETILMICINA CT₅₀

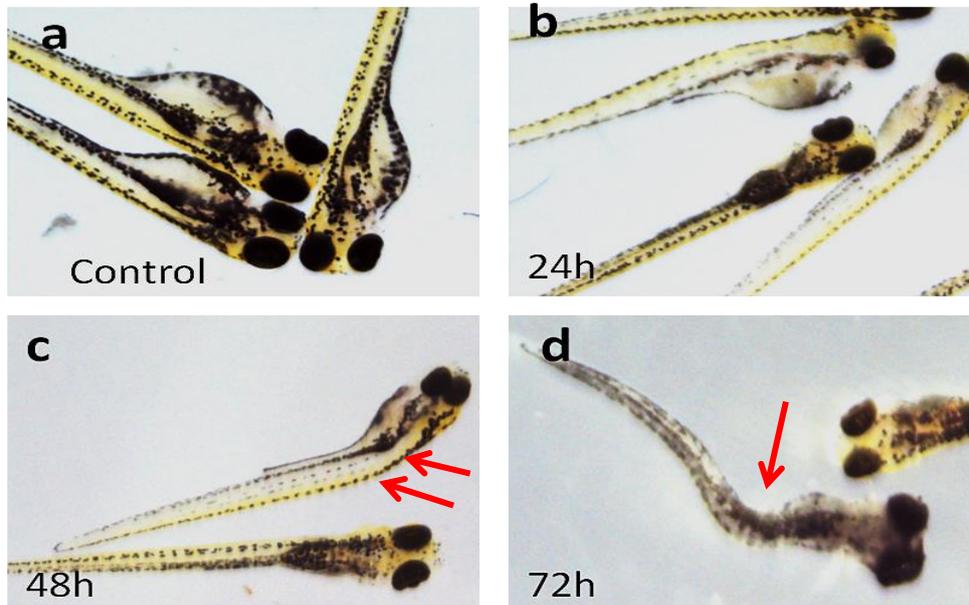


Fig.1b. Morfología de larvas control y expuestas a Netilmicina, a las 24, 48, y 72 horas de tratamiento. A las 24 horas las larvas presentaron similitud morfológica con los controles. A los 48 horas el efecto predominante en el 50% de la población fue la curvatura trocal (doble flecha). Mientras que a las 72 horas se registro el 100% de mortalidad. Se destaca el estado de necrosis larvaria (flecha). barra=0,5mm

Gentamicina

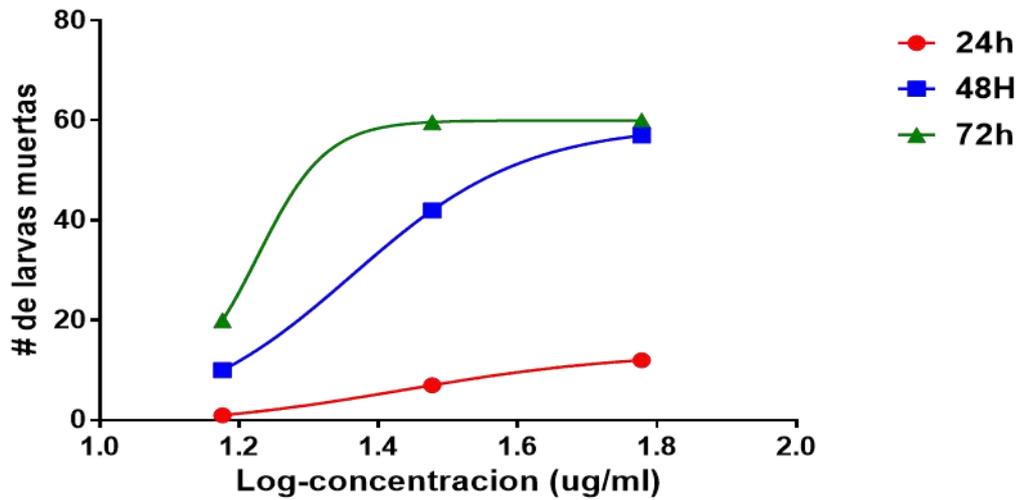


Fig.2a. Gentamicina induce mortalidad concentración-tiempo dependiente. Cada punto corresponde al valor promedio de 3 experimentos realizados por triplicado con un n=30 larvas por punto.

GENTAMICINA CT₅₀

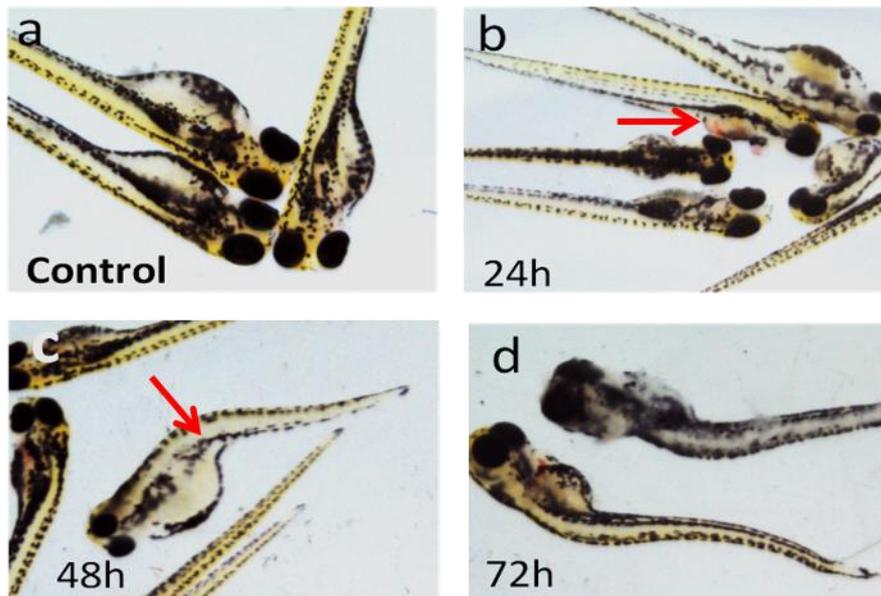


Fig.2b. Morfología de larvas control y expuestas a Gentamicina, a las 24, 48, y 72 horas de tratamiento. A las 24 horas las larvas presentaron similitud morfológica con los controles. Sin embargo el 10% presento acumulo sanguíneo de la porción abdominal (flecha). A las los 48 horas el efecto predominante en el 50% de la población fue la curvatura trocal pronunciada (doble flecha). Mientras que a las 72 horas se registro el 100% de mortalidad, con 50% de la población necrosada (flecha) y presencia de trombo sanguíneo en el resto de la población. barra=0,5mm

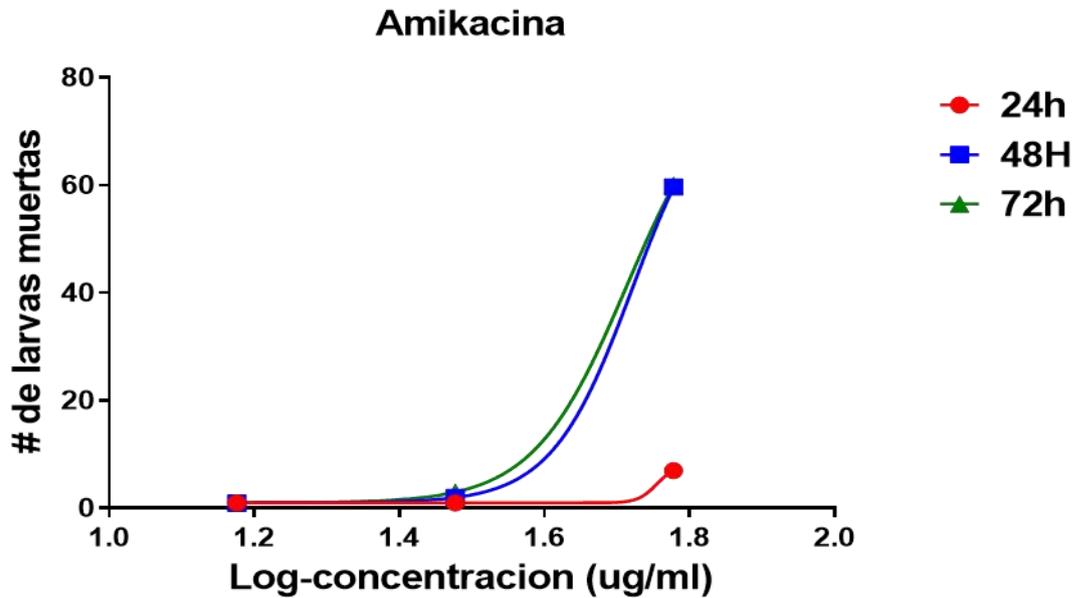


Fig.3a. Amikacina induce mortalidad concentración-tiempo dependiente. Cada punto corresponde al valor promedio de 3 experimentos realizados por triplicado con un N=30 larvas por punto.

AMIKACINA CT₅₀

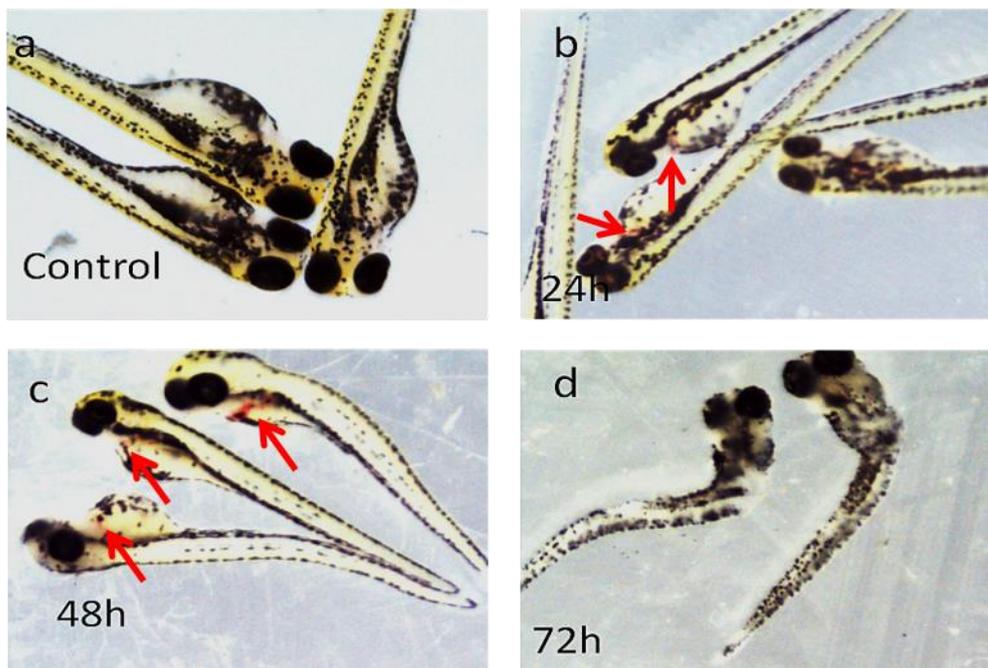


Fig.3b. Morfología de larvas control y expuestas a Amikacina, las 24, 48, y 72 horas de tratamiento. A las 24 horas las larvas presentaron similitud morfológica con los controles. Sin embargo se destaca un 20% de larvas con presencia de acumulo sanguíneo en el área cardíaca (flecha), que se incrementa a las 48 horas. A las los 48 horas el efecto predominante en el 50% de la población fue la curvatura trocal pronunciada (doble flecha). Mientras que a las 72 horas se registro el 100% de mortalidad, con la totalidad de larvas necrosada (flecha). barra=0,5mm

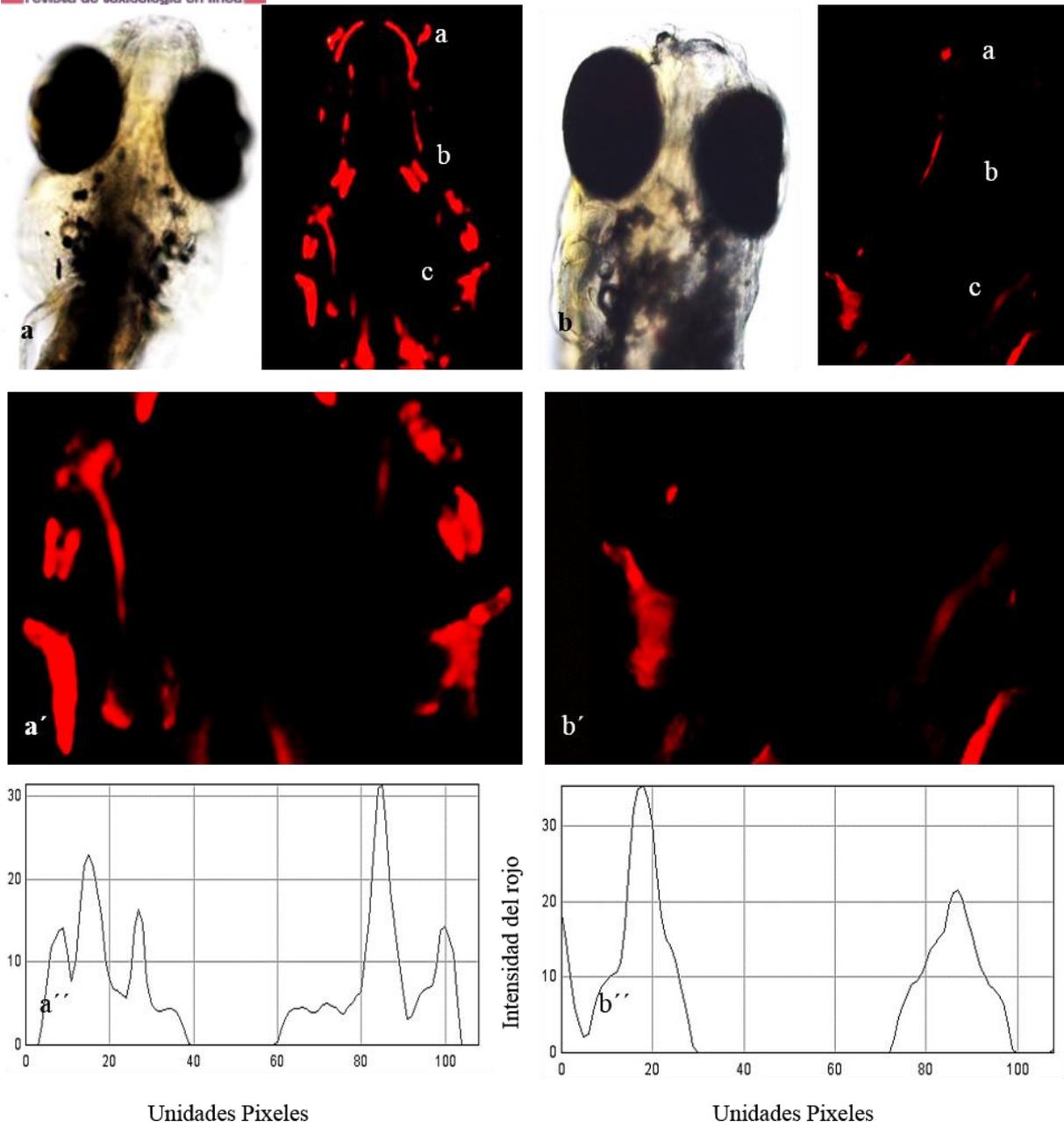


Fig.4. Registro fotográfico de la anatomía de la región craneofacial de larva de 5dpf, control y tratada con Gentamicina. Microscopia de fluorescencia de los núcleos de osificación marcados con Rojo de Alizarina. En comparación con el control (Fig.4a), en las larvas tratadas se observa reducción en la intensidad del marcaje con Alizarina en las regiones del arco mandibular (a), arco hioideo medio (b) y arco hioideo caudal (c). Este ultimo de destaca a mayor aumento control (a') y tratado (b'). La reducción de intensidad del marcaje se destacan en variaciones en los histogramas de densidad control (a'') y tratado (b'').

Bibliografía

1. Palomino J., Pachón J. Aminoglucósidos. *Enferm.Infecc.Clin.* 2003; **21(2)**: 105-15.
2. Faucher K., Aas-Hansen O., Damsgard B., Laukli E., Stenklev N. Damage and Functional Recovery of the Atlantic Cod (*GadusMorhua*) Inner Ear Hair Cell Following Local Injection of Gentamicin. *Int. J.Audiol.* 2009;**8(3)**: 1-9.
3. Morales A., Arévalo M., Pérez-Barriocanal F. Mecanismos Implicados en la Nefrotoxicidad Producida por Aminoglucósidos. *Nefrología.*2000; **20(5)**: 408-414.
4. Murillo-Cuesta S., Contreras J., Cediell R., Varela-Nieto I. Comparissonof Different Aminoglycoside Antibiotic Treatments to Refine Ototoxicity Studies in Adult Mice. *Lab. Anim.* 2010;**44(2)**: 124-131.
5. Bird N., Mabee, P. Developmental Morphology of the Axial Skeleton of the Zebrafish, *Danio rerio*(Ostariophysi: Cyprinidae). *Dev. Dyn.* 2003; **228**: 337–357.
6. Kimmel C., DeLaurier A., Ullmann B., Dowd J., McFadden M. Modes of Developmental Outgrowth and Shaping of aCraniofacial Bone in Zebrafish. *PLoSOne.*2010; **5(3)**:e9475. DOI: 10.1371/journal.pone.0009475.
7. Mork L., Crump G.Zebrafish CraniofacialDevelopment: A Window into Early Patterning.*Curr. Top. Dev. Biol.* 2015; **115**: 235–269.
8. Pasqualetti S., Banfi G., Mariotti M. The Zebrafish Scale as Model to Study the Bone Mineralization Process. *J. Mol.Histol.* 2012;**43(5)**:589-595.
9. Du, S. 2007. Skeletogenesisin Zebrafish Embryos (*Danio rerio*). Handbook of Biomineralization: Biological Aspects and Structure Formation. Alemania. DOI: 10.1002/9783527619443.ch20.
10. Prophet E., Mills B., Arrington J., Sobin L. Manual deTécnicas Histológicas. Métodos Histotecnológicosdel AFID. Registróde Patología de los E.E.U.U. (ARP). 1992. Washington, D.C.
11. Antonetti C. Centros de Osificación de la Mano. *Revista de la Sociedad Venezolana de Ciencias Morfológicas.* 2012; **18**:21-25.
12. Antonetti C. Osificación de las Alas Esfenoides en Fetos Humanos Venezolanos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Ciencias Morfológicas.* 2010;**(16)**:21-25.
13. Mariotti M., Carnovali M., Banfil G. *Danio rerio*: the Janus of the Bone from Embryo to Scale.*Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism.* 2015; **12(2)**: 188-194.
14. Fernandez, M. 2013. Mantenimiento en el Laboratorio del Pez Cebra (*Danio rerio*). Trabajo Especial de Grado. Universidad del País Vasco. España.
15. Spence R., Smith C. Mating Preference of Femake Zebrafish, *Danio rerio*, in Relation to Male Dominance. *Behavioral Ecology.* 2006; **17(5)**: 779–783. DOI:10.1093/beheco/arl016.

16. Hamilton, M., Russo, R., Thurston, R. Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 1977; **11(7)**: 714-719.
17. DeLaurier, A., Eames F., Blanco-Sánchez B., Peng G., He X., Swartz M. y colaboradores. Zebrafish sp7: EGFP: A Transgenic For Studying Otic Vesicle Formation, Skeletogenesis and Bone Regeneration. *Genesis.* 2010; **48**: 505 – 511.
18. Javidan Y., Schilling F. Development of Cartilage and Bone. *Method. Cell Biol.* 2004; **76**: 415 – 436.
19. Zhang F., Qin W., Zhang J., Hu Ch. Antibiotic Toxicity and Absorption in Zebrafish Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *PLoS ONE.* 2015; **10(5)**.
20. Isefuku S., Joyner C., Simpson A. Gentamicin May Have Adverse Effects on Osteogenesis. *J. Orthop. Trauma.* 2003; **17(3)**: 212-6.
21. Strecker R., Weigt S., Braunbeck T. Cartilage And Bone Malformations in the Head of Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos Following Exposure to Disulfiram and Acetic Acid Hydrazide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2013; **268(2)**: 221-31.
22. Pasqualetti S., Congiu T., Banfi G., Mariotti M. Alendronate Recued Osteoporotic Phenotype in A Model of Glucocorticoid Induced Osteoporosis in Adult Zebrafish Scale. *Int. Exp. Pathol.* 2015; **(1)**: 11-20.
23. Pasqualetti, S., Banfi, G., Mariotti, M. The Effects of Strontium on Skeletal Development in Zebrafish Embryo. *J. Trace. Elem. Med. Biol.* 2013; **27(4)**: 375-379.
24. Aceto, J., Nourizadeh-Lillabadi, R., Marée, R., Dardenne, N., Jeanray, N., Wehenkel, L., y colaboradores. Zebrafish Bone and General Physiology are Differently Affected by Hormones or Changes in Gravity. *PLoS ONE.* 2015; **10(6)**: e0126928. DOI:10.1371/journal.pone.0126928.
25. Esterberg R., Hailey D., Coffin A., Raible D., Rubel E. Disruption of Intracellular Calcium Regulation in Integral to Aminoglycoside-Induced Hair Cell Death. *J. Neurosci.* 2013; **33(17)**: 7513-7525.

Recibido: 06/07/16

Aceptado: 07/07/16