



***Aa-Integral-Tox*: un protocolo innovador para evaluar la neuro-cardio-toxicidad haciendo uso de larvas del mosquito *Aedes aegypti*: un modelo animal no convencional**

***Aa-Integral-Tox*: an innovative protocol to evaluate neuro-cardio-toxicity using *Aedes aegypti* mosquito larvae: an unconventional animal model**

MARCO ÁLVAREZ^{*1}, AURORA BARRIOS^{**}, ELIANA NAVARRO^{***}

Resumen

Aa-Integral-Tox: un protocolo innovador para evaluar la neuro-cardio-toxicidad haciendo uso de larvas del mosquito *Aedes aegypti*: un modelo animal no convencional. Explorar los efectos inducidos por agentes tóxicos sobre órganos blancos, ha priorizado la búsqueda de diversos modelos animales de experimentación. Aquí exponemos un modelo no convencional como el estadio larvario del mosquito *Aedes aegypti* (*Aa*), en un protocolo denominado *Aa-Integral-Tox*, para evaluar la neuro-cardio-toxicidad con el uso del clorhidrato de verapamilo. La CL_{50} obtenida fue de 0,6598 mg/mL con un IC95% entre 0,4128 y 1,156. A las 3 hr de tratamiento, en un mismo animal, la conducta de nado (CN) mostró una caída significativa de la velocidad angular (ω), con valores de $-19,55 \pm 15$ rad/s en comparación a los valores control de 101 ± 44 , rad/s, lo cual se tradujo en un índice de variabilidad de conducta de nado de (IvCN) de $0,8127 \pm 0,0158$ e IC 95% entre 0,7817 a 0,8436 $p < 0,0001$. La actividad cardíaca contráctil (ACC) mostró una reducción significativa de la frecuencia promedio de contracción de 68 ± 14 c/s a $22 \pm 2,0$ c/s, con un alargamiento de los intervalos de contracción de $89 \pm 1,5$ ms y $274 \pm 4,94$ ms, lo cual se tradujo en un índice de variabilidad de ACC (IvACC) $0,7948 \pm 0,0194$ % con un IC 95% entre 0,7570 a 0,8326 y un valor de $p < 0,0001$. El marcaje con Rojo de Rutenio determinó un desplazamiento de Ca^{+2} desde el espacio endoperitrófico hacia el espacio ectoperitrófico del cuerpo larvario. Con este modelo alternativo no convencional se podría garantizar altos índices de predictividad para estimar la eficiencia de los bioensayos de toxicidad, impactando sobre los principios de las 3R de los modelos convencionales.

Palabras clave: *Aedes aegypti*, neuro-cardio-toxicidad integral, clorhidrato de verapamilo

Abstract

The exploring effects induced by toxic agents on target organs has prioritized the search for various experimental animal models. Here we present an unconventional model such as the larval stage of the *Aedes aegypti* (*Aa*) mosquito, in a protocol called *Aa-Integral-Tox*, to evaluate neuro-cardio-toxicity with the use of verapamil hydrochloride. The LC_{50} obtained was 0.6598 mg/mL with a 95% CI between 0.4128 and 1.156. At 3 hours of treatment, in the same animal, swimming behavior (SB) showed a significant drop in angular velocity (ω), with values of -19.55 ± 15 rad/s compared to control values of 101 ± 44 , rad/s, which translated into a swimming behavior variability index (IvSB) of 0.8127 ± 0.0158 and 95% CI between 0.7817 and 0.8436 $p < 0.0001$. The contractile cardiac activity (CCA) showed a significant reduction in the average contraction frequency from 68 ± 14 c/s to 22 ± 2.0 c/s, with a lengthening of the contraction intervals of 89 ± 1.5 ms and 274 ± 4.94 ms, which translated into a CCA variability index (IvCCA) $0.7948 \pm 0.0194\%$ with a 95% CI between 0.7570 to 0.8326 and a value of $p < 0.0001$. Ruthenium Red labeling determined a shift of Ca^{+2} from the endoperitrophic space to the ectoperitrophic space of the larval body. With this non-conventional alternative model, high predictive rates could be guaranteed to estimate the efficiency of toxicity bioassays, impacting the 3R principles of conventional models.

Keywords: *Aedes aegypti*, integral neuro-cardio-toxicity, verapamil hydrochloride

1. Sección de Microscopia, Instituto Anatómico José Izquierdo, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. República Bolivariana de Venezuela. Caracas 1040, Distrito Capital. Correspondencia: alvarezmenator@gmail.com

Orcid: [0000-0002-1781-4532](https://orcid.org/0000-0002-1781-4532)*

Orcid: [0000-0002-4712-0793](https://orcid.org/0000-0002-4712-0793)**

Orcid: [0000-0002-4049-061X](https://orcid.org/0000-0002-4049-061X)***

DOI: [10.54305/RFFUCV.2022.85.1-2.12](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2022.85.1-2.12)

Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 30/08/2022

Aprobación: 20/09/2022

Rev. Fac. Farmacia 85(1y2): 128-138, 2022

Introducción

La necesidad de explorar los efectos inducidos por agentes tóxicos sobre órganos blancos en los seres vivos, ha priorizado la búsqueda de diversos modelos animales de experimentación e índices de funcionalidad que faciliten la identificación de las señales de daños a través de observaciones directas y fáciles de cuantificar (Castillo-Salas y col., 2013). Como es sabido, las señales de daño más comunes han sido caracterizadas a través de bioensayos de toxicidad realizados en los modelos animales convencionales que, por lo general, continúan siendo el estándar de oro para la predicción del riesgo tóxico en humanos (Olson y col., 2000; Euwema y Swanson, 2022). Sin embargo, ha sido claramente demostrado que estos bioensayos resultan altamente costosos ya que requieren grandes cantidades de estos animales, así como de gran cantidad de compuestos para realizar las pruebas que no siempre resultan predictivas. Esta situación ha hecho pensar qué la identificación de señales de daños inducidas por agentes tóxicos pudieran también ser obtenidas a través de otros modelos animales no convencionales, de menor costo y mayor facilidad para su obtención y mantenimiento (Gullace y Caturin, 2020). De la búsqueda de nuevos modelos animales de experimentación, ha surgido el pez cebra con el cual particularmente en nuestro laboratorio hemos generado algunos aportes de reconocida significancia (Zanotty y col., 2019; Álvarez y col., 2021). Sin embargo, hasta el poder adquirir y mantener a dicho modelo, nos ha resultado oneroso. Ante tal circunstancia y por encima de todas las limitaciones, hemos explorado otros modelos no convencionales como es el caso del estadio larvario del mosquito *Aedes aegypti* (*Aa*), una alternativa que

exponemos en la presente investigación bajo un protocolo innovador que hemos denominado *Aa-Integral-Tox*, inspirado en un protocolo diseñado para el pez cebra, el *ZeGlobalTox* (Cornet y col., 2017). Al igual que dicho protocolo, nuestro *Aa-Integral-Tox*, integra la respuesta neuro-cardio-tóxica en un mismo animal, impactando así sobre los principios básicos de las 3R, reducción, remplazo y refinamiento de los modelos convencionales. Pensamos que este modelo alternativo no convencional podría garantizar los altos índices de predictividad que proponen algunos autores para estimar la eficiencia de los bioensayos de toxicidad (Hornberg y col., 2014; Blomme y col., 2016). Con el uso del modelo larvario del mosquito de *Aa*, hemos podido identificar, medir y cuantificar fácilmente, en un mismo animal, la toxicidad aguda y los efectos subletales de algunos compuestos específicos (Álvarez y col., 2021a; Álvarez y col., 2021b., Barrios y col., 2022., Hernández y Álvarez., 2020). En esta oportunidad, para la validación de nuestro protocolo integral de experimentación toxicológica, *Aa-Integral-Tox*, hemos hecho uso del fármaco Pamiwell-80, una versión comercial del clorhidrato de verapamilo (clo-ver), para cuantificar la respuesta neuro-cardio-tóxica a través de su efecto sobre el comportamiento del nado (CN) y la actividad cardiaca contráctil (ACC) de las larvas del mosquito *Aa*. Cabe destacar que el verapamilo, es un conocido bloqueador no dihidropiridínico de los canales lentos de Ca^{+2} tipo L, generador de efecto inotrópico y se sospecha que posee la propiedad de anestésico local (<https://anestesiario.org/2010/revision-anestésicos-locales-i/>), 1,6 veces mayor a una concentración equimolar de procaína (Fahie y Cassagnol, 2022; Basile, 2004; Flynn y Pasko, 2000). A pesar de su conocida y frecuente aplicación

en el tratamiento de la hipertensión arterial sistémica y pulmonar, angina de pecho, arritmias, hemorragia subaracnoidea, miocardiopatía hipertrófica, ha sido recientemente clasificado como un agente mortal a dosis única (Euwema y Swanson, 2022), un efecto subyacente a toda esa actividad beneficiosa reportada.

Materiales y Métodos

PROTOCOLO DE EXPERIMENTACIÓN

Nuestro protocolo *Aa-Integral-Tox* ha sido pensado como una herramienta metodológica para detectar, en un mismo animal, las señales de daño que pudieran estar subyacentes a la acción beneficiosa de los agentes medicamentosos de amplio uso en la medicina. En tal sentido contempla: 1) un ensayo de toxicidad aguda, en este caso con el clo-ver y 2) la identificación y cuantificación de los efectos subletales. Para ello, las larvas de *Aa*, fueron colocadas al azar en cápsulas de 24 pozos a razón de 4 larvas/pozo/concentración, a temperatura ambiente, en un rango de concentraciones de clo-ver (0,1 mg/mL a 1,6 mg/mL de solución fisiológica 0,9%), definida a partir de la concentración única seleccionada de acuerdo con la información registrada recientemente sobre su clasificación como un agente mortal a dosis única. El ensayo de toxicidad permitió determinar la concentración letal y tóxica cincuenta (CL_{50} , CT_{50}) a ser utilizadas en la evaluación de los efectos tóxicos subletales a partir de la cuantificación de la mortalidad y la toxicidad larvaria. Para el análisis de los efectos tóxicos subletales fueron analizadas las larvas sobrevivientes a los distintos tratamientos. Así, se evaluó la respuesta larvaria a la luz UV, los cambios en el movimiento zigzagante o conducta

de nado (CN), así como variación de la actividad cardiaca contráctil (ACC), consideradas como señales de daño (Barrios y col., 2022). Por otra parte, cabe destacar que se hizo uso de larvas de pez cebrá mantenidas en el laboratorio (Álvarez y col., 2021), como control positivo de la acción toxica del verapamilo descrita por otros autores (Xiaoqing y col., 2016). Las larvas de pez cebrá fueron sometidas a la CT_{50} . El Pamiwell-80 utilizado fue suministrado por la Dra. Maritza Padrón de la Cátedra de Farmacología del Instituto de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela. N° code GUJ/DRUGS/G/25/1667. Lote N°DT11is.05/2021-04/2024. Wellona Pharma.

REGISTRO DEL COMPORTAMIENTO DE NADO (CN)

Las larvas tratadas y sobrevivientes fueron transferidas individualmente hacia un portaobjeto con un espacio circunferencial definido por un aro metálico colocado sobre el portaobjetos, lo cual permitió circunscribir el campo de observación y el área circular del movimiento zigzagante de las larvas en un mínimo de solución 500 μ l. Una vez enfocada la muestra, bajo el lente objetivo de un microscopio estereoscópico Nikon SMZ800, con cámara Nikon adaptada e iluminación episcópica, se realizaron videos cortos de 30 s, a razón de 15 cuadros/s. Se eliminaron las posibles fuentes de artefactos de movimiento, así como sombras, reflejos y cambios en la intensidad de la luz o deformaciones en la imagen como resultado de la curvatura de la lente. Para la cuantificación del comportamiento de nado, los respectivos videos obtenidos fueron analizados mediante el programa de análisis y construcción de modelos, Tracker (Conklin y col., 2015). Para el análisis, el trazo de los

movimientos zigzagueante fue considerado como un proceso continuo de encogimiento (larva curvada) y relajación (larva estirada) dentro de un ciclo de movimientos cóncavo-convexo en un área circular. Dichos movimientos fueron seguidos por un punto de masa fijados, entre la porción cefálica y caudal, y registrados a lo largo del video. El procesamiento generó un Tacograma del perfil del movimiento larvario, así como un fichero de datos numéricos que fueron trasladados al Programa Estadístico GraphPad Prism para la estimación de la velocidad angular, ω (rad/s).

REGISTRO DE LA ACTIVIDAD CARDIACA CONTRÁCTIL (ACC)

Una vez realizado el registro de CN en las larvas tratadas sobrevivientes, las mismas larvas fueron colocadas bajo el objetivo de 10x de un microscopio Olympus BX50 de contraste de fase BX50, con cámara Nikon a través de la cual fue ubicada la región cardiaca abdominal inmediatamente medial a los troncos traqueales longitudinales. Dicha región fue circunscrita a un área rectangular de búsqueda sobre la cual se realizaron videos de 30 s a razón de 15 cuadros/s. El análisis cuantitativo de la ACC fue realizado en el mismo programa de análisis Tracker, simulando la dinámica de una partícula en movimiento oscilatorio. Para ello, fue definido un punto de ACC en la región cardiaca el cuál fue seguido de forma automática a lo largo de la secuencia de cuadros de los respectivos videos. El registro de ACC, generó un fichero de datos numéricos que fue trasladados al programa estadístico GraphPad Prism para la obtención del perfil gráfico de la frecuencia de ACC, visualizado a través de una secuencia de ondas de contracción con picos de intervalo c-c, en función del

tiempo. La realización de la gráfica en un Tacograma de la ACC permitió realizar la estimación de las variables estadística como la frecuencia promedio de contracción (fpc) y con ello el valor de la duración de los respectivos intervalos c-c, de acuerdo con el cálculo utilizado para la obtención del tiempo de duración del intervalo R-R de un electrocardiograma (My EKG. 2022). Los valores de desviación estándar de dichos intervalos de tiempo permitieron obtener la variación de la ACC-total (vACC-t).

TINCIÓN *IN VIVO* CON ROJO DE RUTENIO

Una vez realizados los registros de la CN y la ACC en la población larvaria tratada y sobreviviente, se procedió a una incubación *in vivo* de dichas larvas en una solución de Rojo de Rutenio (RR), un colorante inorgánico utilizado en microscopía para la tinción diferencial y diagnóstico del movimiento del calcio citoplasmático. Este ha sido clasificado como una herramienta farmacológica para analizar posibles mecanismos celulares vinculados con la inhibición del transporte de calcio a través de los canales de membrana (Vincent y Duncton, 2011) y en los últimos años ha sido promovido como un posible agente bloqueante de la activación de canales iónicos estimulados por la sobre carga de calcio sistólico inducida en condiciones fisiopatológicas (Nazıroğlu, 2022). Se utilizó una concentración de 0,01% en el agua de cultivo de las larvas, a un pH de 7,4, durante un tiempo de 15 seg. Transcurrido el tiempo de coloración fue registrado el patrón del marcaje de las larvas con el RR y analizadas con el programa Image J. Fiji. El histograma del marcaje en esta población larvaria sobreviviente fue contrastado con el del marcaje de las larvas control.

Análisis estadístico

La relación sensibilidad/especificidad, representada a través de la curva de operación característica del receptor (*Receiver-Operating Characteristic* [ROC]), denominada curva ROC, por sus siglas en inglés, permitió caracterizar, a través del valor del Área Bajo la Curva (ABC), el índice de variabilidad de la CN (IvCN) y el Índice de variabilidad de la actividad cardíaca contráctil (IvACC), en función de los cambios en la velocidad angular y en la frecuencia promedio de contracción cardíaca, respectivamente. El análisis estadístico de todos los datos fue realizado a través de ANOVA de una vía, acompañado con la prueba complementaria de Brown-Forsythe realizado con el programa GraphPad Prism.

Resultados

TOXICIDAD AGUDA

El efecto letal del clo-ver sobre la población larvaria de mosquitos *Aa*, se obtuvo a las 3 hr del tratamiento quedando representado a través de la respuesta de mortalidad ante las concentraciones utilizadas y fue expresado en una curva concentración/respuesta con transformación lineal con ajuste de intervalos de confianza de 95% (IC 95%) (Figura 1), a partir de la cual se obtuvo una $CL_{50} = 0,6598$ entre un IC 95% entre 0,4128 y 1,156 mg/mL. La CL_{50} , aplicada a las larvas de pez cebra permitió corroborar la alta tasa de mortalidad larvaria promovida por el clo-ver. A diferencia de las larvas de *Aa*, en donde el efecto letal fue registrado a las 3 hrs del tratamiento, las larvas de pez cebra comenzaron a experimentar perturbación de la CN, reducción significativa de la

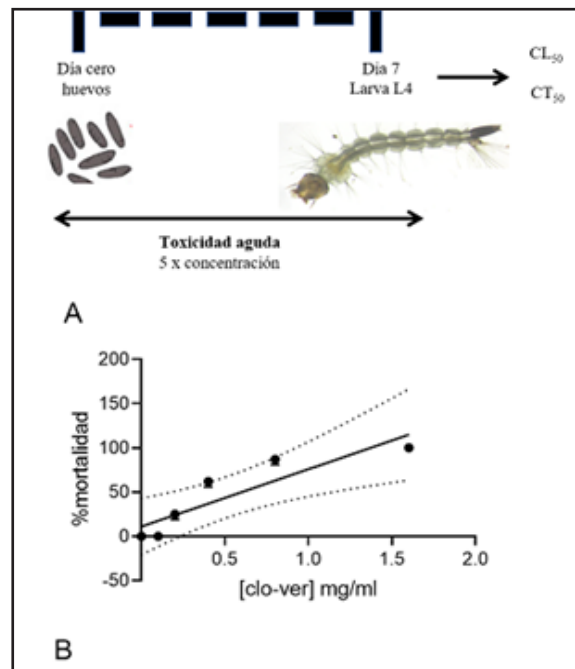


Figura 1. Protocolo *Aa-Global-Tox*. Parte A. Toxicidad aguda clo-ver. Letalidad. Cinco concentraciones de clo-ver: 01, 02, 0,4, 0,8, 1,6 mg/mL. Transformada de la relación concentración & respuesta mortalidad. Ajuste no lineal. $CL_{50} = 0,65$. IC 95% 0,4 a 1,1 mg/mL. N=16 larvas/punto

velocidad angular (ω), $p < 0,0001$, torsión corporal y paralización cardíaca a los 30 s de contacto con la CL_{50} del clo-ver (Figura 2).

EFFECTOS SUBLETALES

Los efectos subletales fueron registrados en el 50% de la población larvaria sobreviviente a la CL_{50} , a nivel del patrón normal de la CN (Figura 3A) y del patrón normal de la ACC (Figura 3B). Respecto a las señales de daño producidos por el clo-ver sobre la conducta de nado (CN), representados en el Tacograma de CN, (Figura 4A), se pudo determinar que el patrón normal de movimientos cóncavos-convexos cambia, presentando una reducción significativa de las fases contorsión (c) y un incremento en las fases de reposo (r), o estado de reposo

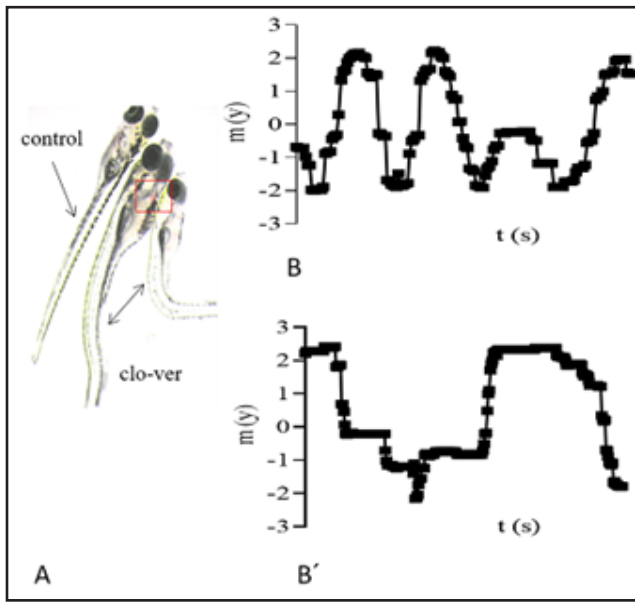


Figura 2. Larvas de pez cebra tratadas con clo-ver $CL_{50}=0,65$ mg/mL. $N=16$ larvas/punto. Grupo de larvas control y tratadas (A). Cardiotoxicidad inmediata con paralización del bombeo sanguíneo (recuadro), acompañada de torción corporal (flechas), trazos desincronizados durante el desplazamiento enlentecimiento con reducción de la velocidad angular hasta la paralización completa y muerte (B, control y clo-ver. (B). Control $\omega = 10,78 \pm 8,4$ %/s. clo-ver. $\omega = 8,3 \pm 1,2$ %/s.

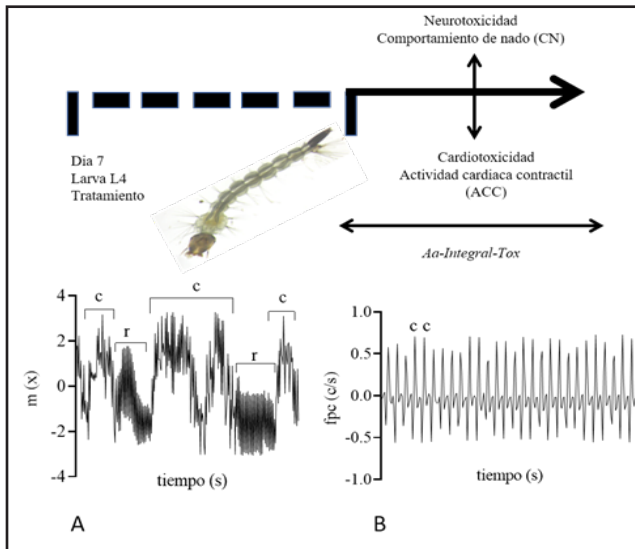


Figura 3. Protocolo *Aa-Global-Tox*. Parte B. Organotoxicidad. Efectos subletales. Larvas sobrevivientes a la CT_{50} . Neurotoxicidad (A). Patrón normal promedio del comportamiento de nado (CN). Tacograma de CN. Representación del desplazamiento larvario en el eje x en función del tiempo (s), con fases de contorsión (c) y reposo (r). Cardiotoxicidad (B). Patrón normal promedio de la actividad cardíaca contráctil (ACC). Tacograma de la ACC. Representación de la frecuencia promedio de contracción (fpc) en función del tiempo. Picos de contracción (c) e intervalos c-c

prolongado, con una caída a cero de la velocidad angular (ω). Se obtuvieron valores de ω para el control de 101 ± 44 , rad/s, para el clo-ver de $-19,55 \pm 15$ rad/s, (Figura 4A´). Bajo esta condición no hubo respuesta al estímulo UV. Respecto a las señales de daño producidos por clo-ver sobre la actividad cardíaca contráctil (ACC), se pudo determinar que el patrón normal cambia, presentando una reducción significativa de la frecuencia promedio de contracción con un retardo en el tiempo de aparición entre los intervalos de sístole y diástoles o picos de c-c (Figura 4B). Las respectivas frecuencias promedio de contracción (fpc): control y clo-ver fueron de 68 ± 14 c/s y $22 \pm 2,0$ c/s, respectivamente (Figura 4B´). A partir de estos valores de fpc, se pudieron determinar los valores promedio de los intervalos c-c correspondientes, particularmente; $89 \pm 1,5$ ms y $274 \pm 4,94$ ms. La desviación estándar de dichos valores ($N=24$), permitió obtener la variación de la ACC-t, particularmente para un valor promedio normal de 1,41 ms (A) y de 4,9 ms clo-ver (B), con una estadística significativa arrojada del ANOVA, de $***p < 0,0001$ y $r^2 = 0,99$, fortalecida con la prueba de Brown-Forsythe que arrojó un $***p < 0,0001$, expresándose como resultado que la $vACC-t(B) > vACC-t(A)$. A una menor frecuencia de contracción una mayor variabilidad del intervalo c-c.

ÍNDICE DE VARIABILIDAD DE LA CONDUCTA DE NADO (IvCN)

De la relación sensibilidad/especificidad del parámetro de velocidad angular (ω) antes y después del tratamiento con clo-ver, se obtuvo un ABC de $0,8127 \pm 0,0158$ % con un IC 95% entre 0,7817 a 0,8436 y un valor de $p < 0,0001$, lo cual se traduce en una probabilidad de aproximadamente 84,36 % de seleccionar al azar larvas con reducción

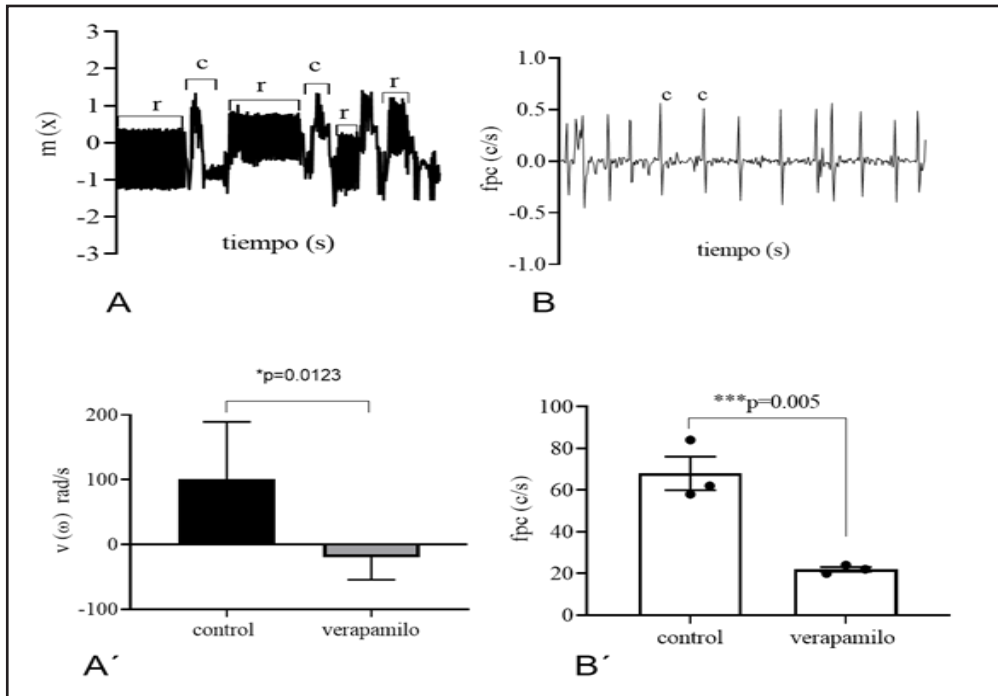


Figura 4. Tacograma del CN en larvas sobrevivientes. Incremento de las etapas de reposo (A), con reducción significativa de la velocidad angular (A'). Tacograma de ACC (B), con alargamiento del intervalo c-c y una reducción significativa de la frecuencia promedio de contracción (B')

de velocidad angular en una población larvaria tratada, respecto a la selección en una población control (Figura 4A).

ÍNDICE DE VARIABILIDAD DE LA ACTIVIDAD CARDIACA CONTRÁCTIL (IvACC)

De la relación Sensibilidad/Especificidad del parámetro de variabilidad de la ACC antes y después del tratamiento con clo-ver, se obtuvo un ABC de $0,7948 \pm 0,0194$ % con un IC 95% entre 0,7570 a 0,8326 y un valor de $p < 0,0001$, lo cual se traduce en una probabilidad de aproximadamente 79,48 % de seleccionar al azar larvas con reducción de frecuencia de contracción e incremento en el intervalo c-c en una población larvaria tratada respecto a la selección en una población control (Figura 5 A y B).

TINCIÓN CON RR

El marcaje positivo al RR de las larvas control (Figura 6A), se presentó circunscrito,

con mayor intensidad, a la región de los ciegos gástrico (cg) (recuadro A), así como al espacio endoperitrófico (eendp) (flecha. A'), mientras que en las larvas tratadas con clo-ver (Figura 6B), se presentó esparcido hacia el espacio ectoperitrófico (eectp), (Figura 6B'), y con menor intensidad. El análisis histomorfométrico permitió visualizar dicho esparcimiento (Figura 6C).

Discusión

Los resultados obtenidos permitieron demostrar que el protocolo de experimentación diseñado para un modelo animal no convencional como el de la larva del mosquito *Aedes aegypti* (Aa) y que hemos denominado *Aa-Integral-Tox*, resultó ser un bioensayo innovador, de mucho menor costo y de mayor accesibilidad. El protocolo *Aa-Integral-Tox*, permitió la evaluación *in vivo*, en un mismo animal, de dos importantes señales de daño, como

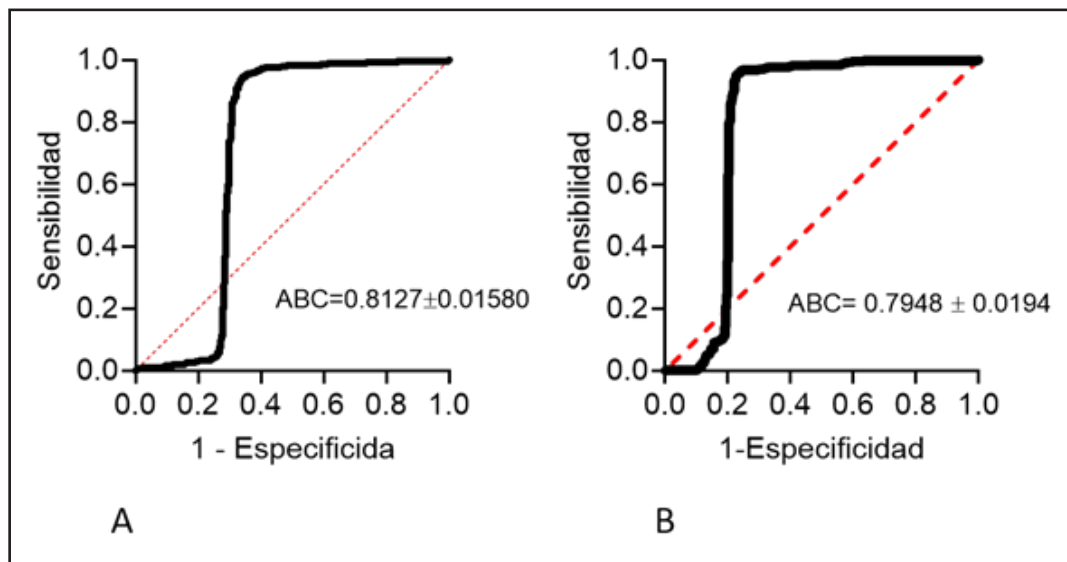


Figura 5. Sensibilidad y especificidad de la prueba de toxicidad del clo-ver. (A). Índice de variabilidad de la conducta de nado (IvCN) en función de la variabilidad de la velocidad angular (ω). (B). Índice de variabilidad de la actividad cardíaca contráctil (IvACC) en función de la variabilidad de la frecuencia promedio de contracción

la neuro y la cardiotoxicidad, subyacentes, en este caso, al clorhidrato de verapamilo (clo-ver), un fármaco bloqueante de los canales de Ca^{+2} tipo L, en su presentación comercial de Pamiwell-80. Hasta donde se conoce, ningún registro al respecto ha sido reportado. Cabe destacar que, a nivel experimental, el verapamilo ha sido usado para estudiar la insuficiencia cardíaca en modelo larvario de pez cebra y que también, por otros autores, se ha mostrado su relevancia en el del pez cebra para predecir la neurotoxicidad a mucho más bajas concentraciones (Irons y col., 2010; De Esch y col., 2012; Legradi y col., 2014). Si bien la expresión de neuro-cardiotoxicidad, registrada por nuestros resultados son equivalentes a las encontradas por los autores antes señalados, se obtuvo a una mayor concentración y menor tiempo. Una mayor concentración que, en las larvas del *Aa*, tardó mayor tiempo para expresar iguales señales de daño. Es decir que podríamos estar hablando de una característica de toxicidad diferencial para el verapamilo, dependiente de la especie,

de la concentración y de los tiempos de exposición, en contraste con otros autores. Con el uso de clo-ver, las larvas de pez cebra resultaron ser más sensibles respecto a las larvas del mosquito *Ae*. En cuanto a la neurotoxicidad, validada a través del IvCN, cabe destacar que las investigaciones sobre los sistemas sensoriales de los mosquitos constituyen un recurso valioso debido a la amplia variedad de vías sensoriales que han sido descritas para este invertebrado (Montell y Zwiebel, 2016). A pesar de que numerosos estudios han aclarado que muchas de esas vías sensoriales están mediadas por receptores y particularmente fotorreceptores, un conocimiento sobre la vinculación de estos fotorreceptores con las respuestas motoras no ha sido claramente establecido, entre otras razones y según algunos autores, debido a la carencia de estudios capaces de monitorear al mismo tiempo dicha vinculación (Bui y col., 2019). Dentro de los fotorreceptores descritos para larvas del *Ae*, el gen que codifica para rodopsina *Aaop8* y que funciona como receptor ultravioleta,

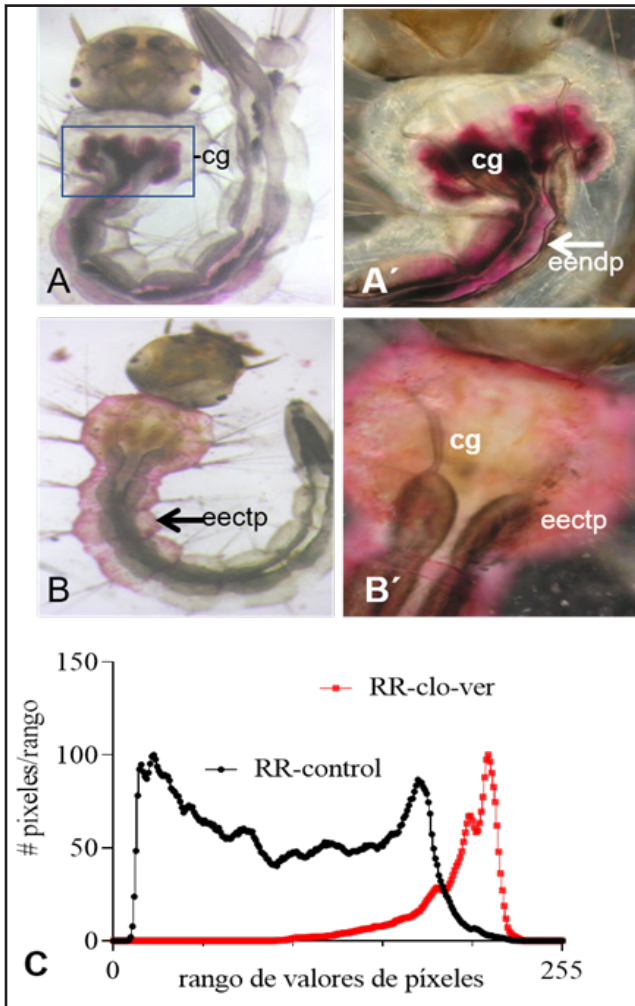


Figura 6. Marcaje de larvas de *Aedes aegypti* con RR. Control (A-A'). Se destaca el colorante retenido en los ciegos gástricos (cg). clo-ver (B-B'). Se destaca la dispersión del colorante hacia el espacio endoperitroífico. El histograma de densidad en valores de pixeles (C) cuantifica el mayor marcaje de RR contenido en el espacio y su redistribución con el tratamiento de clo-ver

ha sido identificado dentro de las células fotorreceptoras R7 especializadas que divide la retina de los mosquitos *Aedes aegypti* (Hu y col., 2014). Si bien nuestros resultados carecen de una identificación de dicho receptor, la pérdida de la sensibilidad larvaria a la luz UV, en presencia de clo-ver, demostrada en nuestros resultados, sugiere una posible vinculación entre la pérdida de la actividad motora observada y una posible alteración de este fotorreceptor. Otros ensayos serán necesarios para corroborar

si el sistema de fotorreceptores de luz UV pudiera ser considerado considerado como posible órgano blanco de acción de agentes como el verapamilo. En cuanto a la cardiotoxicidad, validada a través del IvACC, nuestros resultados han fortalecido la estructura cardiaca del modelo larvario del mosquito *Aa* como un órgano blanco en bioensayos de toxicidad. A pesar de ser un órgano pequeño, delicado y de difícil de manipulación, su ciclo de contracción y relajación, como en la mayoría de los animales de experimentación, se traduce en unión reversible entre Ca^{+2} y las proteínas contráctiles como paso final de la actividad cardiaca contráctil (Glen y col., 2010). El sistema cardiaco de las larvas de *Aa*, a través de su conformación tubular, de fibras estriadas, organizadas en sarcómeros, con toda la maquinaria de líneas Z y túbulos T (Barbosa Da Silva y col., 2019), respondió al clo-ver, muy probablemente a través de un desequilibrio en la homeostasis del calcio promovido por las características del fármaco. Un desequilibrio que pudiera traducirse en la descompartimentalización de sitios de almacenamiento de calcio como fue puesto en evidencia a través del marcaje con RR. Su aplicación pareciera conducirnos a pensar que las membranas epiteliales internas de la estructura larvaria pudieran ser definidas como posibles sitios blancos de acción del verapamilo. Por último, cabría expresar que el protocolo *Aa-Integral-Tox*, repercutió sobre los principios de las 3R, ya que permitió, con dos índices fisiológicos del mismo animal y no en animales por separados, obtener más información con menor número de animales. Contar con dos nuevos índices de funcionalidad biológica con una alta sensibilidad y eficiencia, como el IvCN y el IvACC, abre las puertas no solo para explorar sobre posibles estrategias para el

control de mosquitos, sino también para avanzar hacia un mejor conocimiento de la biología de estos insectos, contribuyendo a la vez a la promoción del mismo como un modelo alternativo en la experimentación animal.

Conflicto de interés

Los autores declaran que no tienen conflicto de interés.

Referencias Bibliográficas

- Álvarez A, Álvarez M, Perdomo L, Rodríguez A. 2021. Clinical cardiac alteration and hemostatic toxicities caused by Scorpion (*Tityus discrepans*) venom and its purified fraction on Zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Invest Clin* 62 (4): 325-338.
- Álvarez M, Hernández C, Morales E, Hernández F, Velásquez V, Zuleta G. 2021. Respuestas morfofuncionales de larvas de mosquito *Aedes aegypti* a la Tetrametrina-Real-ZZ®. *Rev Toxicol* 38: 34-38.
- Álvarez M, Hernández C, Barrios A. 2021. Respuesta funcional y morfológica ante la luz uv emitida por larvas de *Aedes aegypti* tratadas bajo condiciones de oxidación avanzada: Un análisis morfométrico. *Retel: Revista de Toxicología en Línea* 64: 48-84.
- Basile J. 2004. El papel de los bloqueadores de los canales de calcio existentes y más nuevos en el tratamiento de la hipertensión. *J Clin Hipertens (Greenwich)* 6 (11):621-29.
- Barbosa da Silva H, Godoy RSM, Martins GF. 2019. The Basic Plan of the Adult Heart Is Conserved Across Different Species of Adult Mosquitoes, But the Morphology of Heart-Associated Tissues Varies. *J Med Entomol* 56(4):984-996.
- Barkai AI, Williams RW. 1983. The exchange of calcium in larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. *J Exp Biol* 104:139-48.
- Barrios Rudas ADV, Álvarez Ochoa MA, Navarro E. 2022. Índices de funcionalidad en las larvas del mosquito *Aedes aegypti* ante la acción del Fipronil: Una aproximación experimental. *Rev Fac Farm* 85(1 y 2):100-110.
- Bensimon-Brito A, Cardeira J, Dionisio G, Huisseune A, Cancela ML, Witten PE. 2019. Revisiting *in vivo* staining with alizarin red S, a valuable approach to analyse zebrafish skeletal mineralization during development and regeneration. *BMC Dev Biol* 16:2.
- Blomme EAG, Will Y. 2016. Toxicology Strategies for Drug Discovery: Present and Future. *Chem Res Toxicol* 29:473-504.
- Bui M, Shyong J, Lutz EK, Yang T, Li M, Truong K, Arvidson R, Buchman A, Riffell JA, Akbari OS. 2019. Live calcium imaging of *Aedes aegypti* neuronal tissues reveals differential importance of chemosensory systems for life-history-specific foraging strategies. *BMC Neurosci* 20(1):27.
- Conklin EE, Lee KL, Schlabach SA, Ian G. Woods IG. 2015. VideoHacking: Automated Tracking and Quantification of Locomotor Behavior with Open-Source Software and Off-the-Shelf Video Equipment. *J Undergrad Neurosci Educ* 13(3): A120-A125.
- Cornet C, Calzolari S, Miñana-Prieto R, Dyballa S, van Doornmalen E, Rutjes H, Savy T, D'Amico D, Terriente J. 2017. *ZeGlobalTox*: An Innovative Approach to Address Organ Drug Toxicity Using Zebrafish. *Int J Mol Sci* 18(4):864-883.
- Chapman RA. 1983. Control of cardiac contractility at the cellular level. *Am J Physiol* 245(4): H535-52.
- De Esch C, Slieker R, Wolterbeek A, Woutersen R, de Groot D. 2012. Zebrafish as potential model for developmental neurotoxicity testing. A mini-review. *Neurotoxicol Teratol* 34:545-553.
- Euwema MS, Swanson TJ. 2022. Deadly Single Dose Agents. 2022. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. PMID: 28722879.
- Fahie S, Cassagnol M. 2022. Verapamil. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. PMID: 30860730.
- Flynn JT, Pasko DA. 2000. Bloqueadores de los canales de calcio: farmacología y lugar en la terapia de la hipertensión pediátrica. *Pediatr Nephrol* 15 (3-4):302-16.
- Glenn JD, King JG, Hillyer JF. 2010. Structural mechanics of the mosquito heart and its function in bidirectional hemolymph transport. *J Exp Biol* 213(4):541-550.
- Gullace FA, Caturin ED. El animal de laboratorio como reactivo biológico. Revisado: 21/05/2020. <http://dpd.fvet.uba.ar/cartelera/00013655.pdf>.
- Hornberg JJ, Laursen M, Brenden N, Persson M, Thougard AV, Toft DB, Mow T. 2014. Exploratory toxicology as an integrated part of drug discovery. Part I: Why and how. *Drug Discov Today* 19:1131-1136.
- Hu X, Leming MT, Whaley MA, O'Tousa JE. 2014. Rhodopsin coexpression in UV photoreceptors of *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* mosquitoes. *J Exp Biol* 217(Pt 6):1003-8.
- Irons TD, MacPhail RC, Hunter DL, Padilla S. 2010. Acute neuroactive drug exposures alter locomotor

- activity in larval zebrafish. *Neurotoxicol Teratol* 32:84-90.
- Legradi J, el Abdellaoui N, van Pomeran M, Legler J. 2014. Comparability of behavioural assays using zebrafish larvae to assess neurotoxicity. *Environ Sci Pollut Res* 22:16277-16289.
- Meinicke AR, Bechara EJ, Vercesi AE. 1998. Ruthenium red-catalyzed degradation of peroxides can prevent mitochondrial oxidative damage induced by either tert-butyl hydroperoxide or inorganic phosphate. *Arch Biochem Biophys* 349(2):275-80.
- Montell C, Zwiebel LJ. 2016. Chapter ten-mosquito sensory systems. In: Raikhel AS, editor. *Advan Insect Physiology*. Cambridge: Academic Press; pp. 293-328.
- Naziroğlu M. 2022. A novel antagonist of TRPM2 and TRPV4 channels: Carvacrol *Metab Brain Dis* 37(3):711-728.
- Olson H, Betton G, Robinson D, Thomas K, Monro A, Kolaja G, Lilly P, Sanders J, Sipes G, Bracken W, Dorato M, Van Deun K, Smith P, Berger B, Heller A. 2000. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul Toxicol Pharmacol* 32(1):56-67.
- Vincent F, Duncton MA. 2011. "Agonistas y antagonistas de TRPV4". *Curr Top Med Chem* 11 (17): 2216-26.
- Xiaoqing Guo, Melanie Dumas, Bonnie L. Robinson, Syed F. Ali, Merle G. Paule, Qiang Gu, Jyotshna Kanungo, 2017. Acetyl L-carnitine targets adenosine triphosphate synthase in protecting zebrafish embryos from toxicities induced by verapamil and ketamine: An *in vivo* assessment. *J Appl Toxicol* 37(2): 192-200.
- Zanotty Y, Álvarez M, Perdomo L, Sánchez EE, Giron ME, Jimenez JC, Suntravat M, Guerrero B, Ibarra C, Montero Y, Medina R, Navarrete LF, Rodríguez-Acosta A. 2019. Mutacytin-1, a New C-Type Lectin-Like Protein from the Venezuelan Cuaima (*Lachesis muta muta* Linnaeus, 1766) (Serpentes: Viperidae) Snake Venom Inducing Cardiotoxicity in Developing Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos. *Zebrafish* 16(4):379-387.
- Zhu XY, Wu SQ, Guo SY, Yang H, Xia B, Li P, Li CQ. 2018. A Zebrafish Heart Failure Model for Assessing Therapeutic Agents. *Zebrafish* 15(3):243-253.