



Desarrollo de un protocolo de Disección y visualización de Islotes Pancreáticos en pez cebra y creación de un manual en la enseñanza de para su aplicación en la enseñanza e investigación Biomédica”

Nombre: Bryan Axel Rios Sanchez

Matricula: 2153009899

Asesor: Dr. Gerardo J. Félix Martínez

# “Desarrollo de un protocolo de Disección y visualización de Islotes Pancreáticos en pez cebra y creación de un manual en la enseñanza de para su aplicación en la enseñanza e investigación Biomédica”

## Introducción

El pez cebra conocido por su nombre científico como *Danio Rerio* es un vertebrado de la clase Actinopterygii. Son peces de la familia Cyprinidae que habitan en agua dulce y están distribuidos ampliamente por el sudeste asiático (India, Bangladesh, Nepal, Myanmar y Pakistan). Esta región se caracteriza por su clima monzónico caracterizado por tener largas temporadas de lluvias y sequías. La química del agua (pH) varía bastante entre dichas regiones, lo que sugiere que los peces cebra están bien adaptados a las distintas fluctuaciones de la química del agua, lo cual explica su tolerancia a una amplia gama de condiciones en cautiverio (*Wilson & Chu, 2022, p. 2*). Se reproducen con facilidad y luego de la fecundación tardan entre 3 y 5 días en convertirse en larvas activas. Alcanzan la madurez sexual, aproximadamente a los tres meses de edad (*revisado por Lawrence, 2007*).

Los modelos experimentales desarrollados en animales nos han ayudado a entender mejor el complicado funcionamiento del cuerpo humano y a desarrollar medicamentos para tratar diversas enfermedades. Los modelos más utilizados en el laboratorio se enfocan al uso de ratas y ratones, pero no son los únicos animales. El uso del pez cebra en los laboratorios de experimentación se implementó alrededor de los años 70 y desde entonces su popularidad ha ido en aumento, ya que se ha convertido en una gran herramienta para el desarrollo de nuevos modelos de investigación que contribuye a grandes avances biomédicos (*Instituto de Ecología A.C., 2021*).

El pez cebra se ha utilizado ampliamente para estudiar el desarrollo y funcionamiento del páncreas. El páncreas del pez cebra está compuesto por compartimentos exocrinos y endocrinos conectados por un sistema de conductos al tracto digestivo como los mamíferos. Los islotes pancreáticos del pez cebra consisten en un núcleo central de células Beta productoras de insulina rodeadas de células alfa productoras de glucagón, células delta productoras de somatostatina y células épsilon productoras de grelina. También se ha observado que el fenotipo es similar al de los humanos (Tomando en cuenta genética, sistema endocrino y metabolismo) también es usado para estudiar enfermedades metabólicas como el hígado graso, en humanos. El pez cebra posee los órganos necesarios para su control metabólico (hipotálamo, páncreas y tejidos sensibles a la insulina) (*Seth et al., 2013*).

## Justificación

La diabetes es un gran problema de salud pública que afecta a millones de personas en México y en el mundo. Su estudio requiere de modelos biológicos accesibles y eficientes para

entender los mecanismos celulares y moleculares detrás de la disfunción de los islotes pancreáticos. En este sentido, los islotes pancreáticos del pez cebra son un modelo ideal debido a su rápido desarrollo, accesibilidad y sobre todo, similitud genética y funcional con los humanos. Este proyecto busca implementar un protocolo de disección de islotes pancreáticos en pez cebra y desarrollar un manual detallado que facilite su uso tanto en la enseñanza como en la investigación. Al estandarizar esta técnica, se contribuirá a la formación de estudiantes tanto de licenciatura como posgrado y a la generación de conocimiento que pueda aplicarse en el estudio de enfermedades metabólicas, promoviendo así avances en la comprensión y el tratamiento de la diabetes.

## Objetivos

1. Implementar un protocolo estandarizado para la disección y aislamiento de los islotes pancreáticos en pez cebra con base en la literatura especializada.
2. Documentar detalladamente cada paso del protocolo, incluyendo materiales, métodos y consideraciones técnicas, para garantizar su reproducibilidad. Cada paso del protocolo, incluyendo materiales, métodos y consideraciones técnicas, para garantizar su reproducibilidad.
3. Elaborar un manual ilustrado que sirva como guía para la enseñanza y la investigación, dirigido a estudiantes y profesionales en el área de ingeniería biomédica.
4. Validar el protocolo mediante la realización de experimentos piloto que demuestren la viabilidad y eficacia de la técnica.
5. Fomentar la formación académica de estudiantes de licenciatura al involucrarlos en técnicas avanzadas de investigación con modelos animales.
6. Contribuir al estudio de enfermedades metabólicas, como la diabetes, proporcionando una herramienta accesible para investigar la función y disfunción de los islotes pancreáticos.
7. Promover la divulgación científica del protocolo y sus aplicaciones a través de talleres, presentaciones o publicaciones.

## Marco Normativo y Ético

Todos los especímenes fueron adquiridos en el Bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM los cuales fueron criados para la Investigación además el Bioterio cuenta con autorización por SADER-SENASICA

En el ámbito Nacional

- NOM-062-ZOO-1999 [5]: Establece distintas especificaciones técnicas para el cuidado y uso de animales de laboratorio, incluyendo peces.
- NOM-033-SAG/ZOO-2014 [6]: Regula los métodos de sacrificio humanitario, aplicable a peces en investigación.
- NOM-087-ECOL-SSA [7]: Brinda especificaciones para la separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos (RPBI).

En el ámbito Internacional

- AAALAC International (Asociación para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de los Animales de Laboratorio) [8]: Incluye pautas para el manejo de peces en laboratorio, como densidad poblacional y enriquecimiento ambiental, además de tener una guía(AAALAC International, s.f.) sobre el alojamiento y cuidados del pez cebra.
- AVMA Guidelines for Euthanasia (2020) [9]: Brinda diversos métodos aceptados para eutanasia en peces (ej. Enfriamiento rápido o shock térmico)
- FELASA-AALAS RECOMENDACIONES [10]: Brinda Protocolos para analgesia y bienestar en peces de laboratorio.

## Principio de las 3R (Reemplazo, Reducción y Refinamiento)

El presente protocolo de investigación se enmarca en el cumplimiento del principio de las 3Rs (Reemplazo, Reducción y Refinamiento), el cual guía el uso ético de animales en investigación biomédica, promoviendo alternativas que minimicen su sufrimiento y número, sin comprometer la validez científica del estudio (*Russell & Burch, 1959*).

En el presente manual se hará uso de peces cebra adultos, especie ampliamente aceptada como modelo vertebrado en estudios biomédicos debido a su tamaño, transparencia embrionaria y similitudes genéticas con los seres humanos (*Lieschke & Currie, 2007*).

La selección de peces cebra adultos se justifica en una correcta visualización de los órganos que componen al pez cebra, así como la necesidad de obtener registros intracelulares y

extracelulares de los islotes pancreáticos, los cuales son inviábiles en etapas de embriones o larvas debido a su menor desarrollo anatómicamente.

En cuanto al principio de **Reducción**, se implementará un diseño experimental optimizado en el que se obtendrán múltiples registros por individuo, maximizando la información obtenida por cada espécimen. Posteriormente, los datos recabados servirán como base para el desarrollo de modelos computacionales precisos de la actividad electrofisiológica de los islotes pancreáticos. Esta estrategia permitirá simular futuras hipótesis experimentales sin necesidad de recurrir a un mayor número de animales, promoviendo así una investigación sustentable y ética (Fenwick et al., 2009).

Respecto al **Reemplazo**, si bien el uso de modelos alternativos in vitro no es viable en esta fase del estudio debido a las características funcionales que se desean evaluar, el desarrollo de los modelos computacionales permitirá, en etapas posteriores, sustituir en gran medida el uso directo de animales en la validación de nuevas hipótesis.

Finalmente, el **Refinamiento** se asegura mediante la aplicación de técnicas quirúrgicas y de registro que minimicen el dolor y estrés de los animales, el método de Eutanasia Hipotermia por enfriamiento rápido cumple con estándares internacionales y se garantiza la eutanasia humanitaria en cada procedimiento experimental.

En conjunto, las estrategias anteriormente mencionadas aseguran que el presente protocolo cumple con los estándares de bioética en investigación animal.

## Cuidado y Manejo

Los peces serán alojados en un espacio exclusivo en el Laboratorio de Biofísica e Ingeniería de Tejidos en una pecera cuadrada de 20 L, se usará un sustrato de 3 kg de grava el cual será previamente lavado y desinfectado con autoclave, los peces cebra nunca serán mayores a 25 peces, esto fue tomando las recomendaciones (National Research Council, 2011, p 83): Donde los peces cebra adultos (“*Danio rerio*”) en entornos típicos de investigación biomédica generalmente se alojan 5 peces adultos por litro de agua".

Las siguientes recomendaciones de limpieza y manejo se hicieron siguiente literatura especializada (Avdesh, 2012); se utilizará también un termostato para que se mantenga una temperatura constante de 26-28.5°C y se usará agua embotellado para mantener un pH adecuado entre 6.5-7.2 en el agua, además de usar un filtro biológico y de carbón activado, los peces contaron con ciclos de luz/obscuridad de 14hrs/10hrs. Se realizará limpieza una vez por semana cambiando el 30% del agua del fondo con ayuda de un sifón y el filtro también será limpiado con agua destilada, el carbón activado del filtro será cambiado cada 15 días; para mantener un pH adecuado y un ambiente sano se utilizó Suplemento Biológico (NUTRAFIN CYCLE), Acondicionador Coloidal Multifuncional (Pentabiocare) y azul metileno. Los peces serán alimentados con TetraMin Tropical Flakes dando de comer 2 veces al día cada 12 horas con un dispensador automático. La siguiente Imagen muestra las condiciones en las que están los peces.



*Imagen 1. Pecera con los peces ya instalados en la parte inferior grava negra usada como sustrato, a la derecha un termostato, a la izquierda un filtro para mantener en buena calidad el agua y en la parte superior el dispensador programado para dar 2 veces al día alimento.*

## Método de Eutanasia

La eutanasia de los peces cebra adultos (*Danio rerio*) se realizará utilizando un protocolo combinado que garantiza la pérdida rápida e irreversible de la conciencia, minimizando el sufrimiento.

Primero, los peces serán sumergidos en una solución anestésica de tricaina metanosulfonato (MS-222) a una concentración de 250 mg/L, ajustada con bicarbonato de sodio (250 mg/L) para mantener un pH neutro (aproximadamente 7.0). Esta concentración permite inducir anestesia profunda en menos de 10 minutos, caracterizada por la pérdida de reflejos operculares (Matthews, 2012).

Una vez confirmada la pérdida de la conciencia, los peces serán trasladados inmediatamente a un recipiente con agua helada (0–4 °C), en donde permanecerán inmersos durante un mínimo de 20 minutos. Este procedimiento de shock térmico, aplicado tras la anestesia, asegura la muerte irreversible mediante hipotermia profunda, sin recuperación de la conciencia [9]. En caso de ser necesario se aplicará decapitación.

NOTA: La adquisición y administración de anestésicos, así como la eutanasia será supervisada por la médico veterinaria responsable, la DVM, MSc, Ph.D. Yessica Heras-Romero (Registro dirección general de profesiones 4604287).

## Manejo Postmortem

Los restos serán recolectados inmediatamente después de su uso en bolsas rojas de polietileno resistentes a filtraciones, serán depositados en contenedores para R.P.B.I designados para su disposición final siguiendo los protocolos institucionales de bioseguridad del Bioterio de la UAM-I.

## Consideraciones éticas sobre manejo de sustancias peligrosas (CRETIB), material genético y radiactividad

En el presente proyecto no se manejará ni material genético ni radiactividad. Tampoco se utilizará material corrosivo, reactivo, explosivo, inflamable o biológico Infeccioso.

## Materiales

- Microscopio de disección con luz externa.
- Bisturí para disección.
- Vaso de precipitado de plástico
- Vasos de plástico desechables con agua para limpiar herramientas
- Agitador desechable
- Elastómero de silicona sylgard 184 en plato de disección
- Tijeras mayo de 15 cm / tijeras de 15cm de largo con un filo de corte cercano a 39mm
- Pinzas fórceps curvadas / pinzas curvas 11cm de largo y dimensiones de la punta de 0.17mm x 0.1mm
- Espátula de Iris / Espátula dimensiones 12cm de largo y dimensiones de la punta 20 x 1,8 x 0,3 mm
- Alfileres para insecto
- Hielo para eutanasia del pez cebra.
- Desinfectante de instrumentos.

- Solución extracelular (150 mM de NaCl, 5.4 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2mM de CaCl<sub>2</sub>, 1 mM de Glucosa, 10mM de HEPES, realizando el ajuste con NaOH con un pH 7.7).
- Solución intracelular (147.09 mM de KCl, 10 mM de NaCl, 0.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.54mM de CaCl<sub>2</sub>, 5 mM de EGTA, 10 mM de HEPES, realizando el ajuste con KOH con un pH 7.2).

### Método de Disección del Islote Pancreático

Los siguientes procedimientos fueron adaptados de literatura especializada (*Nalle, Franse, & Kinkel, 2017*) en cuanto a la disección de Islotes Pancreáticos.

1. Llene el plato de disección con solución Intracelular.
2. Asegúrese de que el pez esta 100% Eutanizado, después de seguir la metodología anteriormente descrita con MS-122 y Shock Térmico (Imagen 2).



*Imagen 2. Pez Cebra ya Eutanizado sobre agua helada 0-4°C; asegúrese que el pez no esté en contacto directo con el hielo, déjese al pez hasta el cese del movimiento operculario (Movimiento de inhalación y exhalación en branquias y boca) y el cese de cualquier movimiento muscular.*

3. Coloque al Pez Cebra en el plato de disección con el extremo rostral más cercano a tu mano derecha. Asegura su posición con un alfiler de insecto a través de la parte carnosa del cuerpo dorsal a la altura de la aleta anal. Para facilitar la disección, inclina ligeramente hacia arriba el lado ventral del pez, como se muestra en la (Imagen 3)



*Imagen 3. Pez Cebra colocado en posición lateral con la cabeza más próxima a la mano derecha, donde el primer pin (lado izquierdo) es fijado en la parte carnosa del cuerpo dorsal a la altura de la aleta anal, el segundo pin es fijado en la parte de la cabeza, fije el pin más a la derecha de las branquias*

4. Usa las tijeras/bisturí para hacer tres cortes (Observe los cortes a detalle en Imagen 4) de la siguiente manera:
  - Corte 1: Realice el corte en la pared del cuerpo ventral desde la aleta anal hasta a la altura de la aleta pectoral derecha, realice el corte con sumo cuidado para evitar dañar los órganos internos.
  - Corte 2: A la altura de la aleta caudal de la incisión, corta dorsalmente en un lado del cuerpo para ampliar el primer corte. Extiende el corte hacia los músculos axiales.
  - Corte 3: A la altura de la aleta pectoral de la incisión, corta dorsalmente en un lado del cuerpo para ampliar el primer corte, retira con cuidado la aleta dorsal ya que está unida al cleitro y coracoide.



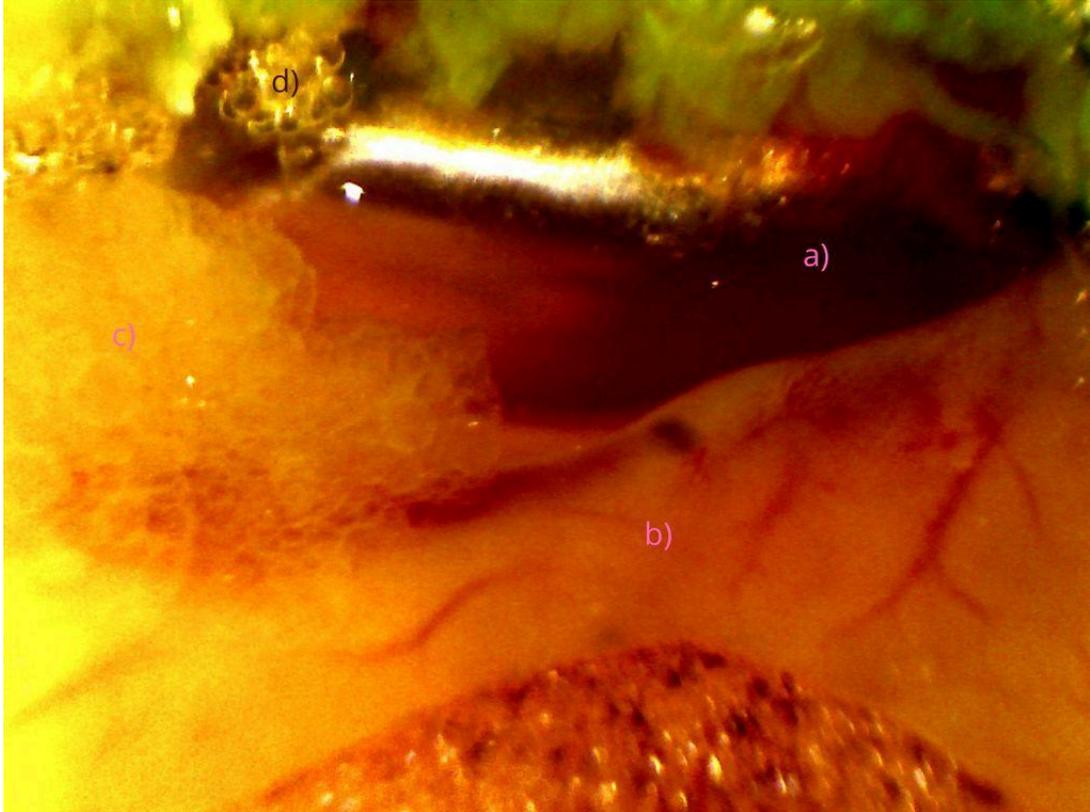
*Imagen 4. Corte 1(Línea punteada rosa): Corte realizado por pared ventral desde la aleta anal hasta la altura de la aleta pectoral. Corte 2(Línea punteada blanca): Corte realizado de manera axial que se extiende desde la altura de la aleta caudal. Corte 3 (Línea punteada azul): Corte realizado de manera axial que se extiende desde la altura de la aleta pectoral derecho.*

5. Posteriormente a haber realizado los 3 cortes anteriormente descritos deberías tener una vista del Pez Cebra con los órganos expuestos (Imagen 5).



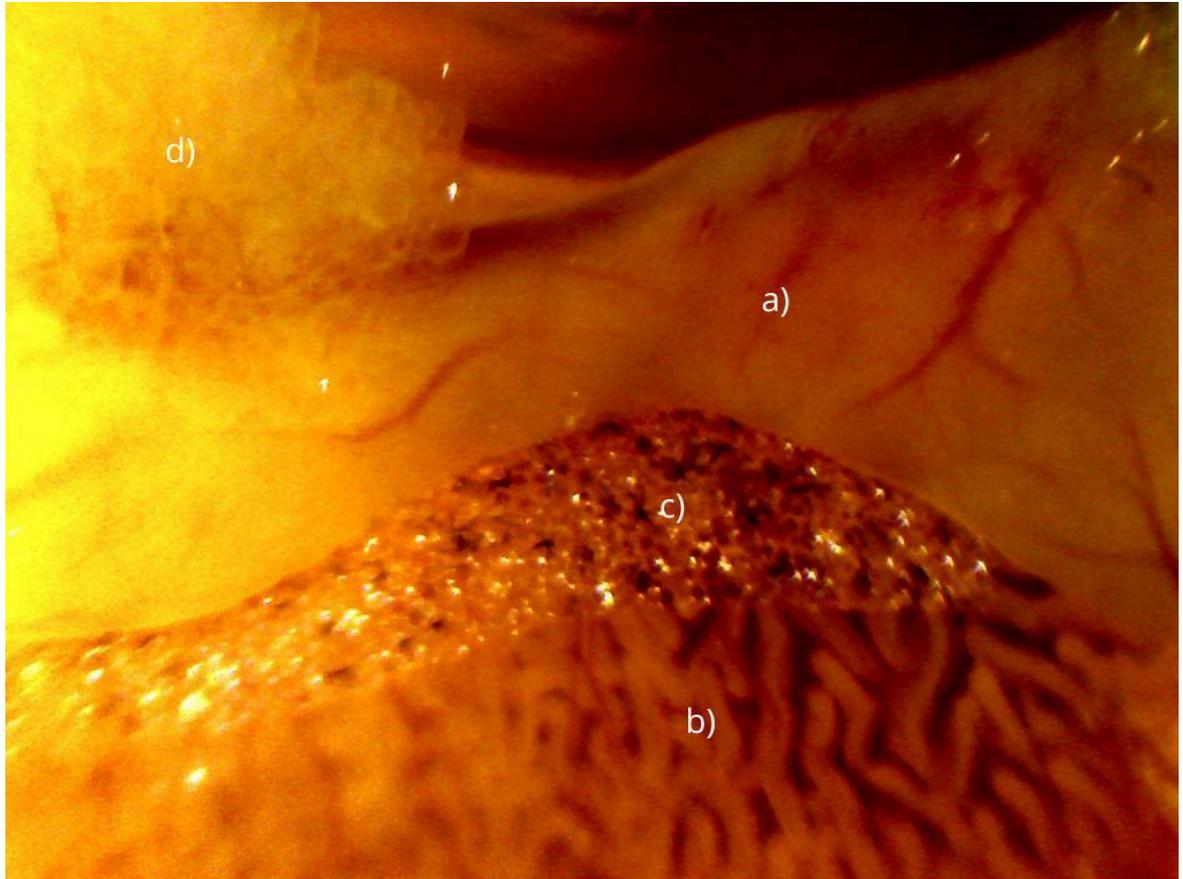
*Imagen 5. Pez Cebra en posición lateral con vista próxima la mano derecha con los órganos internos expuestos posterior a haber realizado los 3 cortes anteriormente descritos.*

6. Una vez tenga los órganos expuestos con ayuda de una espátula o pinzas saque los órganos encontrará varios órganos tales como: vejiga natatoria, hígado, grasa y gónadas. Para mayor detalle de cada órgano observe (Imagen 6).



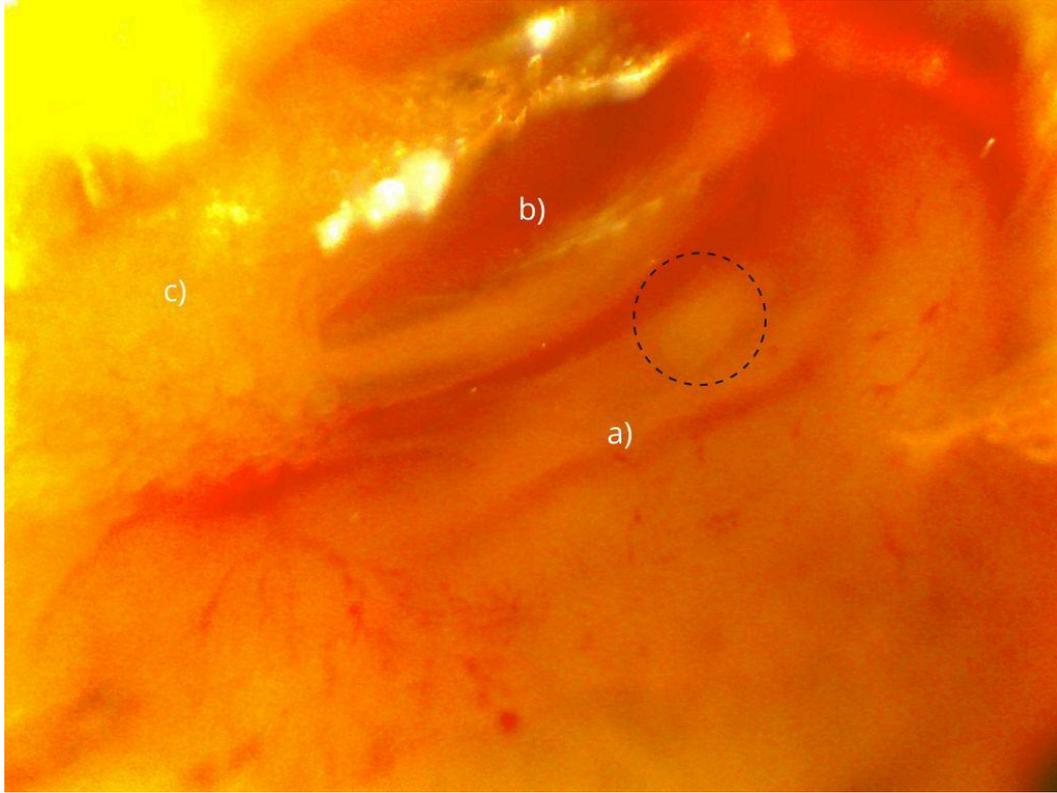
*Imagen 6. a) Vejiga natatoria: De forma ovalada y color transparente, el pez cebra tiene un par de vejigas natatorias las cuales le ayudan a flotar. b) Hígado: De forma alargada y rodea por completo al intestino suele tener un color amarillento o rosado fácilmente reconocido por su vascularidad. c) Gónadas: De forma circular y color rosado cada una de ellas tiene una esfera pequeña dentro de ellas. d) Grasa: Pequeñas y de forma circular de tamaño similar a las gónadas, pero estas tienen un color transparente y muy parecidas a la espuma.*

7. Con ayuda de las pinzas o la espátula limpia la zona quitando gónadas y grasa, por debajo del hígado y con un gran tamaño encontrará al intestino el cual posee un gran tamaño comparable al de la vejiga natatoria (Imagen 7).



*Imagen 7. a) Hígado: De forma alargada y rodea por completo al intestino suele tener un color amarillento o rosado fácilmente reconocido por su vascularidad. b) Intestino: De color café fácilmente reconocible por presentar pliegues longitudinales a lo largo de todo el intestino, se encuentra rodeado por el hígado tanto por arriba como por abajo. c) Grasa: Pequeñas y de forma circular de tamaño similar a las gónadas, pero estas tienen un color transparente y muy parecidas a la espuma. d) Gónadas: De forma circular y color rosado cada una de ellas tiene una esfera pequeña dentro de ellas.*

8. Usa la espátula para levantar entre el hígado y la vejiga natatoria (Observe Imagen 6 de ser necesario) y poder encontrar el islote pancreático se encuentra oculto entre el hígado, la grasa, gónadas y la parte superior del intestino (Imagen 8).



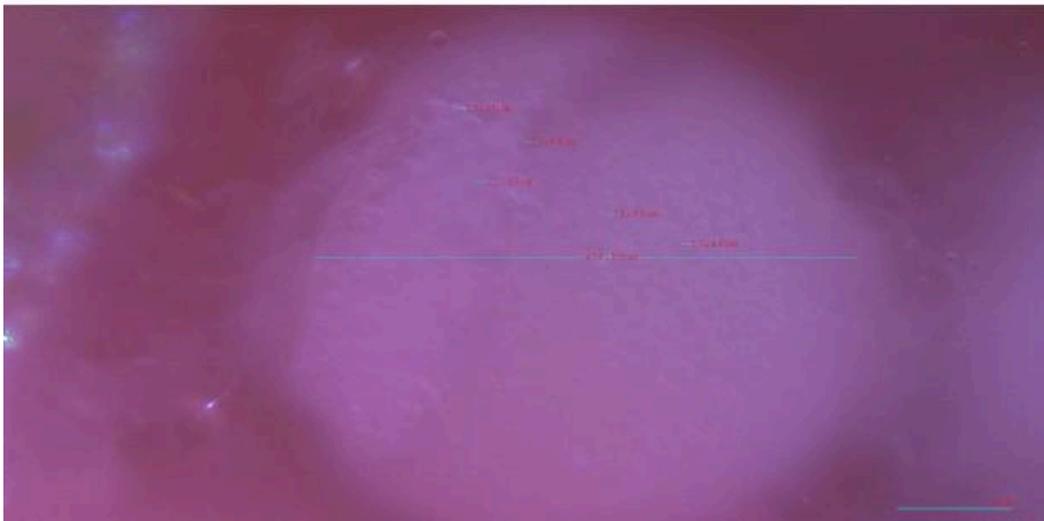
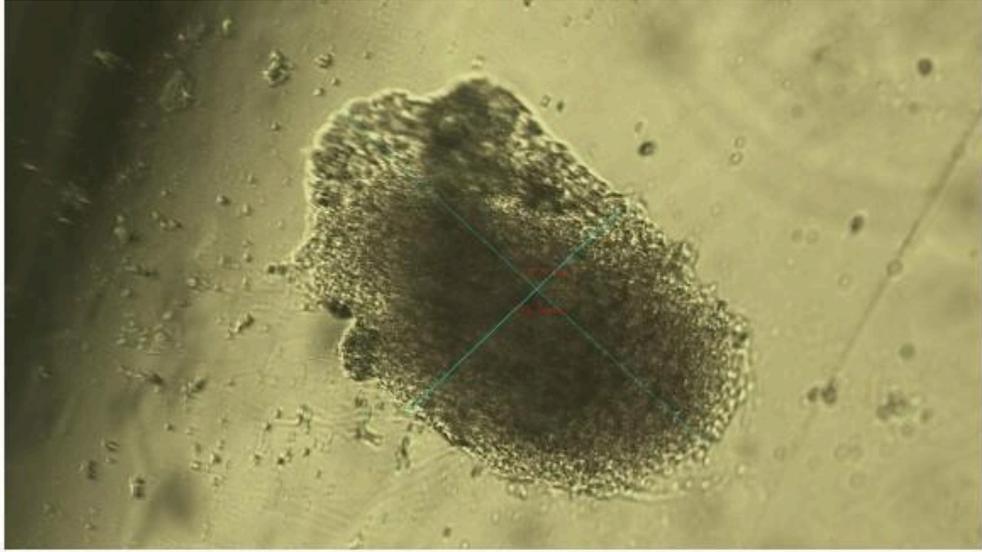
*Imagen 8. a) Hígado. b) Vejiga Natatoria. c) Gónadas. Circulo negro punteado) Islote Pancreático Principal: De forma circular y color blanco en encuentra entre lo profundo del hígado y la parte superior del intestino, rodeado de grasa.*

9. Para asegurarse que se trate de este puede realizar una medición con el microscopio de disección, en nuestros casos se obtuvieron rangos entre 200-500 $\mu$ m (Imagen 9).



*Imagen 9. Muestra al Islote Pancreático Principal el cual tiene una medida de 0.495mm o 495 $\mu$ m (Imagen tomada con el aumento x2 y x10 microscopio AmScope)*

10. Usa la espátula para liberar los órganos de la pared corporal. Usa las tijeras para cortar el extremo más posterior del tubo intestinal. Los órganos ahora deben estar aislados de la cavidad corporal, finalmente puedes retirar el islote y aislarlo para colocarlo en nueva solución intracelular y analizarlo (Imagen 10).

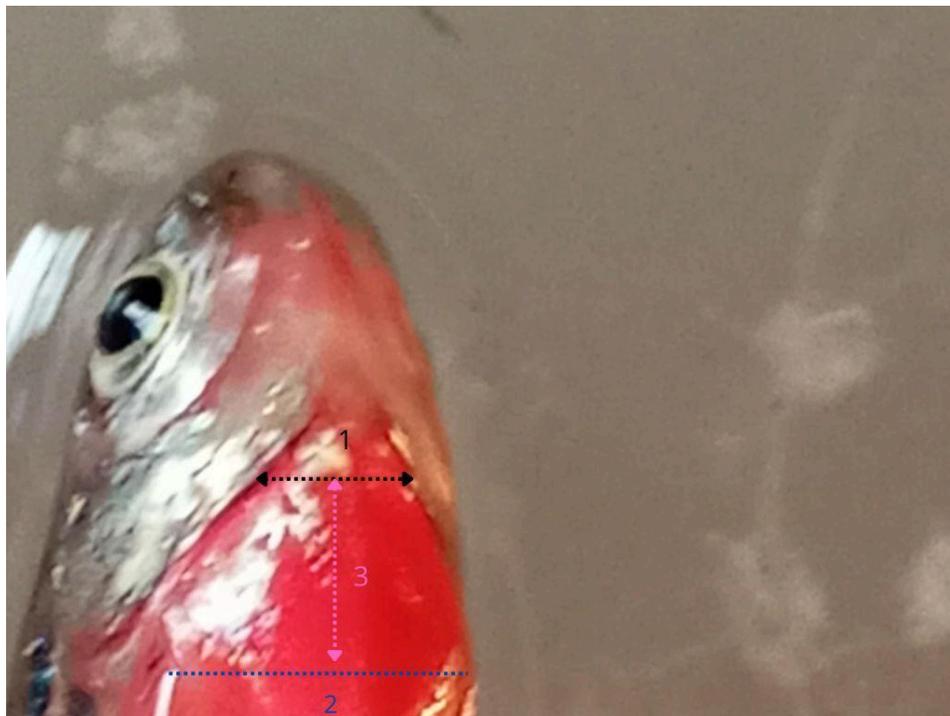


*Imagen 10. En la parte superior tenemos un islote pancreático con radios de 471.94 $\mu$ m y 273.86 $\mu$ m, en la parte de en medio tenemos otro islote con una longitud de 457.52 $\mu$ m y teniendo células de 15.64 $\mu$ m, en la parte inferior otro islote de longitud de 474.86 $\mu$ m y células de tamaños variables 11.85 $\mu$ m-22.27 $\mu$ m.*

## Método de Disección del Corazón

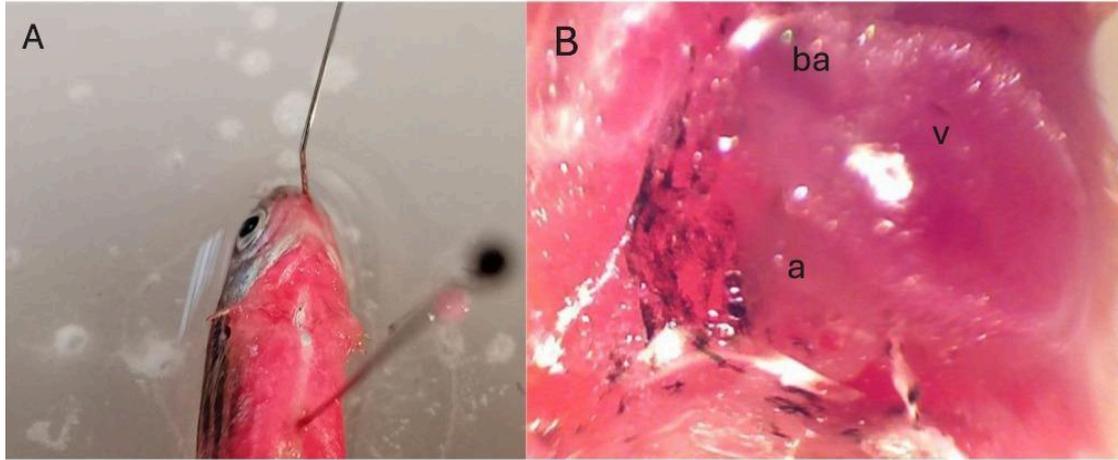
Los siguientes procedimientos se fueron adaptando dado lo presentado en el artículo de (Singleman, 2011) que ofrece una metodología fácil sencilla para la extracción de corazón.

1. Coloque solución intracelular y fije al pez cebra en posición ventral, haga tres cortes con tijeras/ bisturí de menos de 1mm de profundidad, primero haga un corte transversal a través de las branquias, posteriormente haga un corte transversal en el estómago anterior, finalmente haga un corte sagital para conectar ambos cortes (Imagen 11).



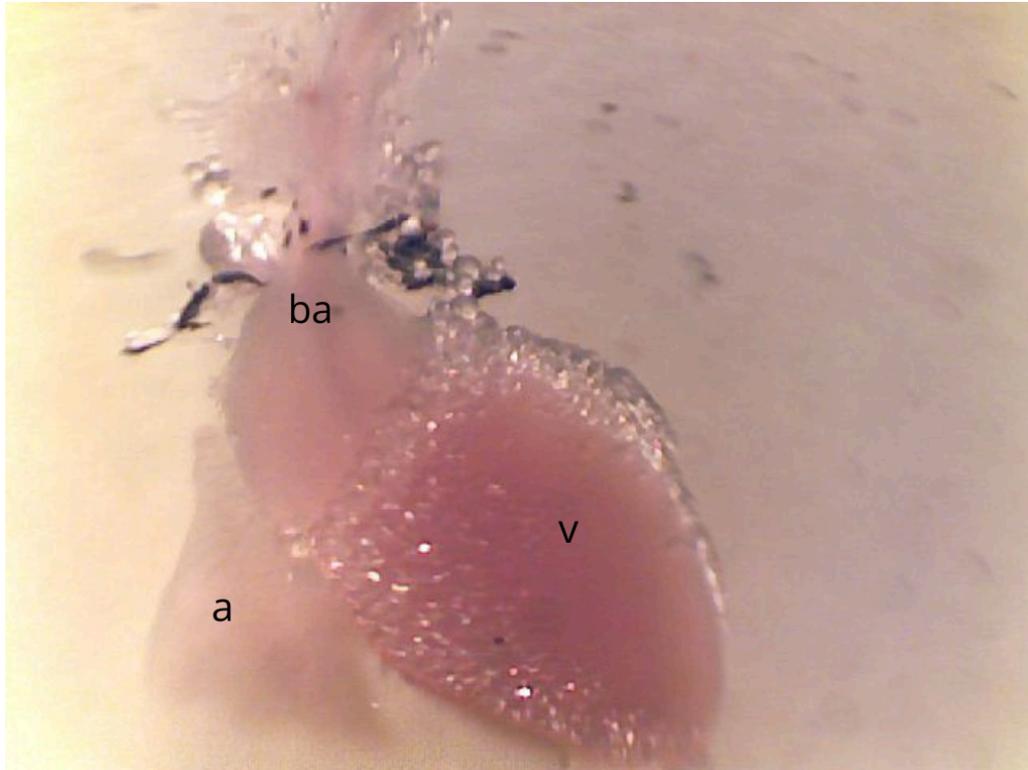
*Imagen 11. Tres cortes para remover los músculos pectorales y la piel: 1- Corte transversal a través de las branquias. 2-Corte transversal en el estómago anterior. 3- Corte sagital en el lado ventral que conecta ambos cortes.*

2. Use fórceps para remover los músculos pectorales y las aletas del cuerpo para abrir la cavidad del cuerpo y revelar el tejido plateado del pericardio, remueve el tejido pericardial y ahora el corazón será visible (Imagen 12).



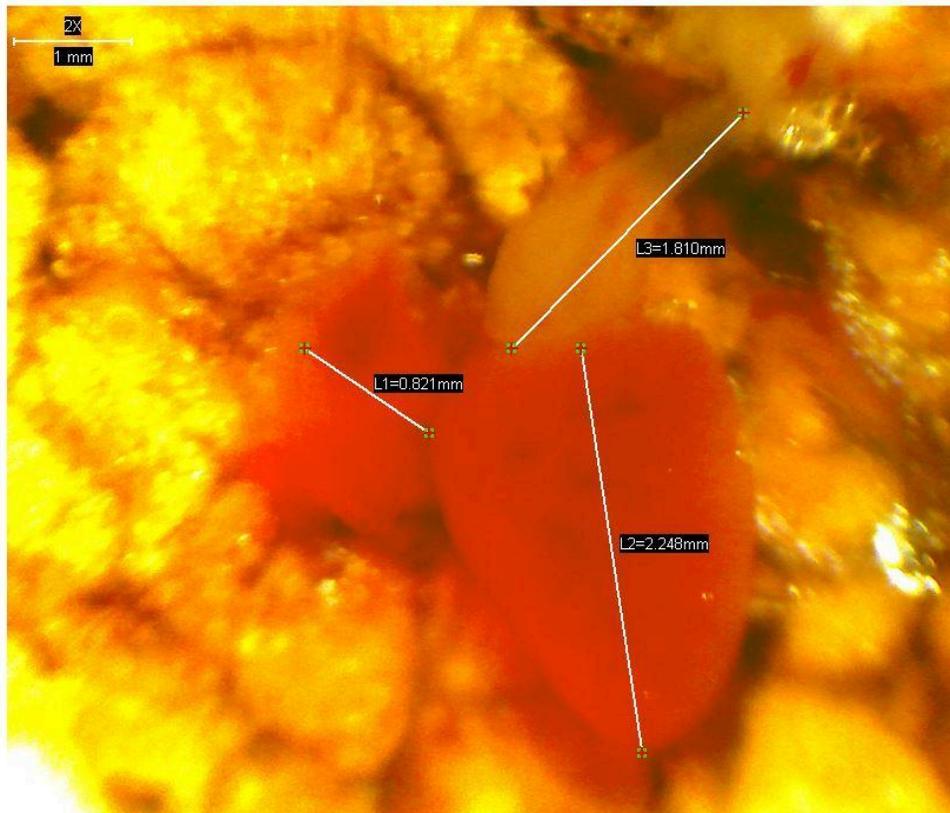
*Imagen 12. Las letras negras minúsculas indican las cámaras del corazón: Bulbo arterioso (ba), Ventrículo (v) y Atrio (a). A) La cavidad superior del cuerpo es abierta para mostrar el tejido plateado del pericardio. B) Después de remover el pericardio, el corazón es visible y removible.*

3. Use las tijeras para cortar la arteria conectada al bulbo arterioso, localizado en la parte superior del corazón. Una vez la arteria ha sido cortada, pon las puntas del fórceps debajo del atrio, usa el fórceps para sacar el corazón fuera de la cavidad, una vez removido limpie el corazón de tejido que no pertenece al corazón (Imagen 13).



*Imagen 13. Corazón aislado del cuerpo, las letras negras etiquetan las cámaras del corazón: bulbo arterioso (ba), ventrículo (v) y aurícula (a).*

4. La siguiente imagen muestra las medidas promedio de un corazón de un pez cebra adulto (4-5cm) (Imagen 14).

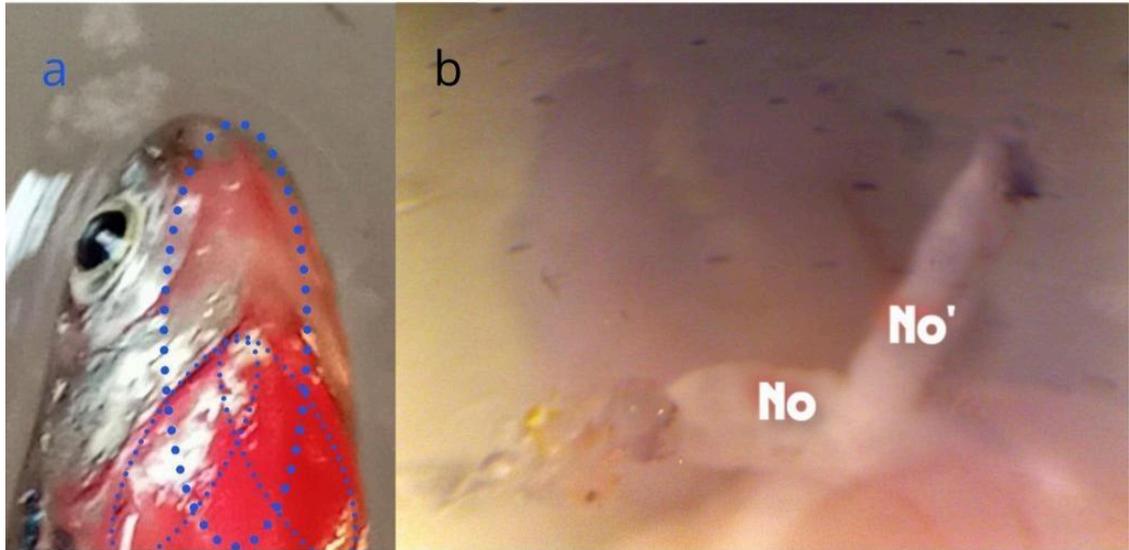


*Imagen 14. El ventrículo mide 2.248mm, el bulbo arterioso mide 1.81mm y la aurícula mide 0.821mm.*

## Método de Disección del Cerebro

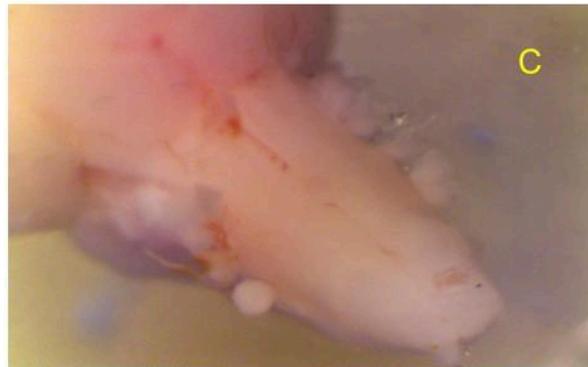
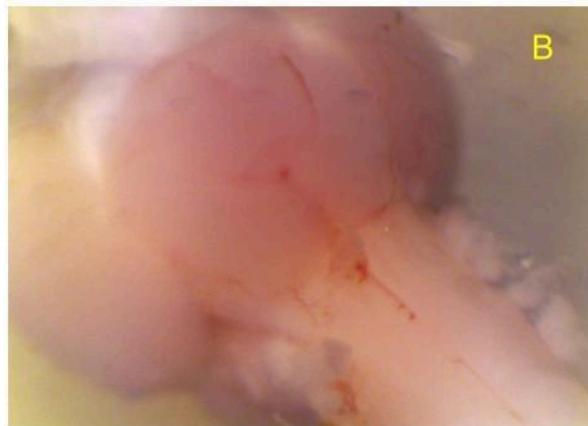
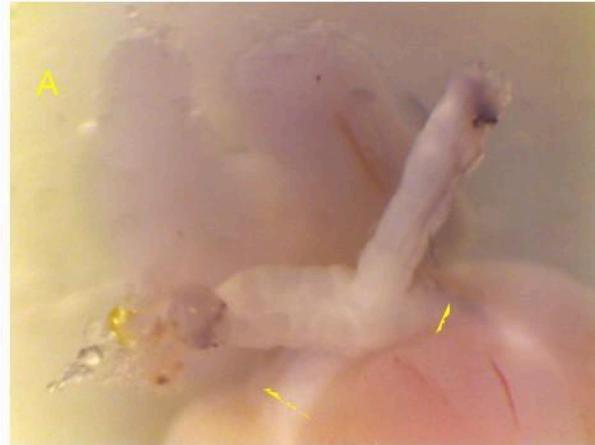
Los siguientes procedimientos fueron adaptados del artículo de (JoVE).

1. Coloque al pez en el plato de disección, decapite al pez a la altura de las branquias, coloque la cabeza del pez cebra en posición ventral hacia arriba y remueve el tejido blando hasta lograr ver el quiasma óptico, dicha estructura está formada de nervio óptico que conecta el cerebro con los ojos (Imagen 15).



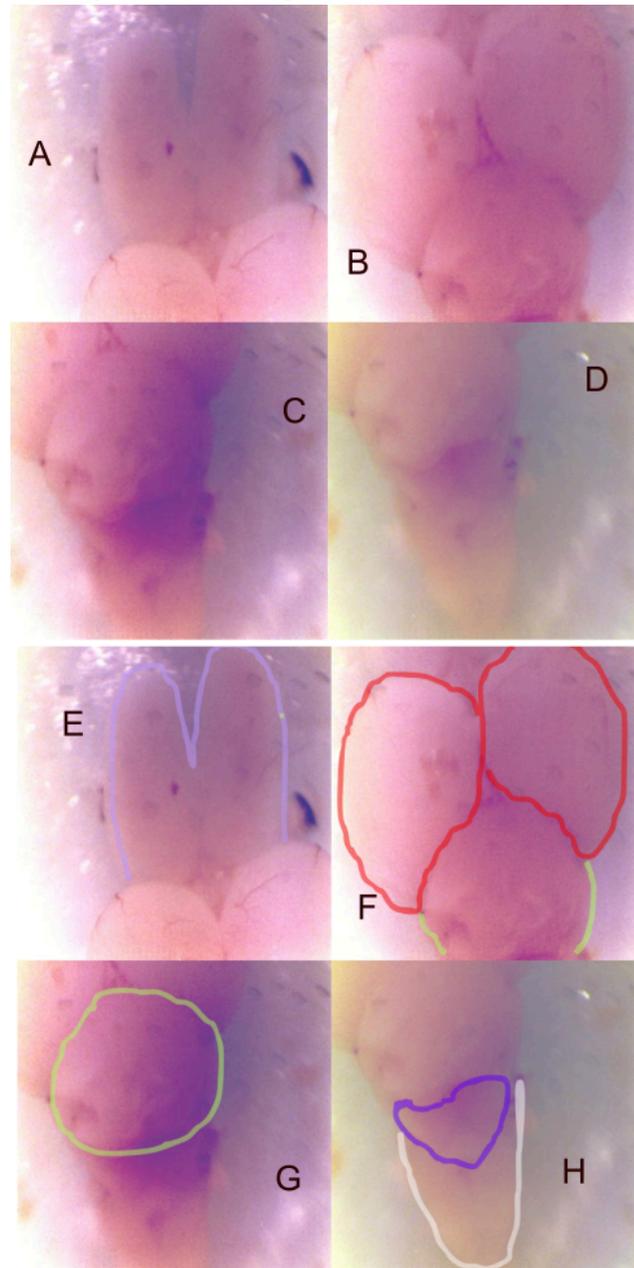
*Imagen 15. a) Muestra al Pez Cebra decapitado y las elipses en color azul muestran las zonas de tejido blando para retirar hasta llegar al quiasma óptico. b) El quiasma óptico se distingue por su color blanco y por tener una forma muy parecida a una X, los nervios ópticos (No y No') provienen de cada ojo, el No proviene del lado izquierdo del cerebro y se conecta con el ojo derecho y el No' proviene del lado derecho y se conecta al ojo izquierdo.*

2. Corta los nervios ópticos y remueve los ojos, el cerebro en posición dorsal antes de cortar los nervios ópticos debería ver así (Imagen 16).



*Imagen 16. Muestra al cerebro completo en posición ventral. A) Se observa al quiasma óptico y al fondo se observa al bulbo olfatorio (Vista Ventral). B) En el centro se observa el tectum óptico que conecta también con el quiasma óptico (Vista Ventral). C) Se observa la médula espinal con un color rosado muy pálido (Vista Ventral).*

3. Coloca el pescado con el lado dorsal hacia arriba y retira las partes del cráneo para aislar el cerebro. Con el cerebro completamente aislado y en posición dorsal encontrarás estructuras tales como el bulbo olfatorio, el telencéfalo, la habénula, el tectum óptico, cerebelo y médula (Imagen 17).



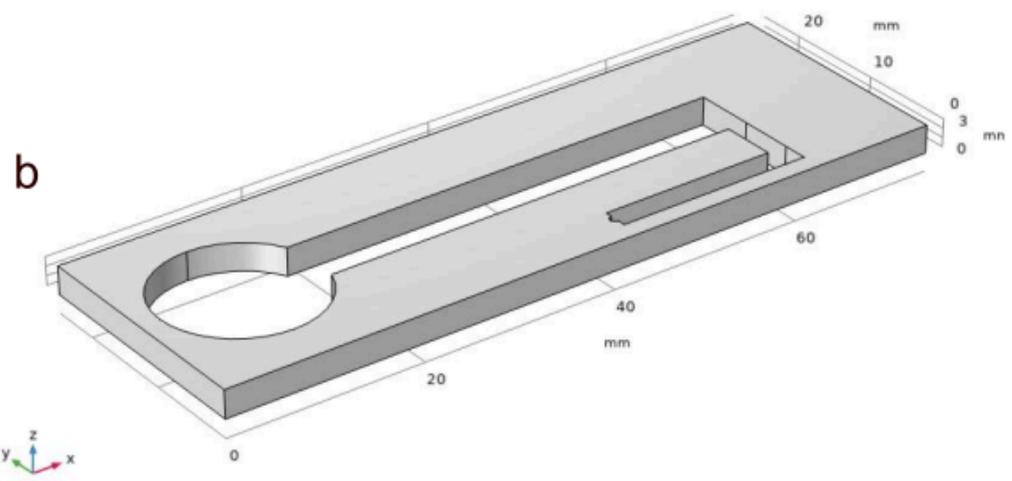
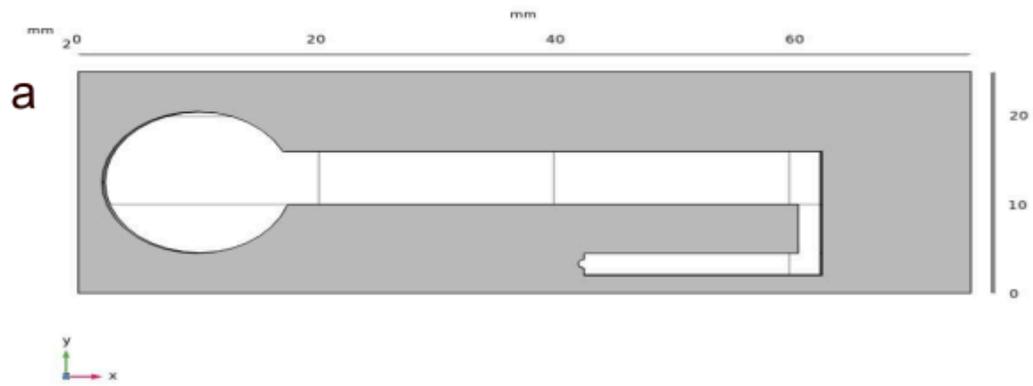
*Imagen 17. A-D) muestra cómo está conformado el cerebro en posición dorsal; E) En color violeta se resalta el bulbo olfatorio y el telencéfalo; F) En color rojo se resalta el tectum óptico; G) En color verde se resalta el cerebelo; H) En color azul y blanco se resalta la médula espinal.*

## Diseño de Cámara para Registro Electrofisiológico

A lo largo de la duración de estos experimentos pudimos notar que dado el tamaño de muchos de los órganos del Pez Cebra estos eran demasiado pequeños para hacer fijación con pines, por lo que se diseñó una cámara de registro Electrofisiológico para poner detener mecánicamente los pequeños tejidos y tener el espacio suficiente para poder sumergir el tejido en solución extracelular como también poder manipular el micromanipulador y la tierra, el diseño de la cámara fue realizado con el Software Comsol Multiphysics versión 8.0.

A continuación, se muestra el diseño de esta y se expone el porqué de tal diseño, además de ser de coste bajo.

1. La mayoría de los tejidos a usar y observar no suelen sobrepasar el orden de los centímetros, por lo que se escogió que la cámara no tuviera un tamaño superior al de un portaobjetos cuadrado (75 x 25 mm) para poder montar esta sobre un portaobjetos y pudiera caber dentro del objetivo del microscopio.
2. Posteriormente una vez delimitado el espacio de trabajo se diseñó un bloque con un ancho y una profundidad con las medidas del portaobjetos (75 x 25 mm) y con una altura de 3mm dicha altura fue escogida para que el tejido pudiera estar sumergido en solución extracelular, pero sin tener tampoco una altura excesiva que provoca que el tejido se moviera mucho.
3. Esta vez se diseñaría algunos cilindros y bloques más pequeños pensando en poder mover la tierra y el micromanipulador, Primero se diseño un cilindro con un radio de 8mm y una altura de 3mm en este cilindro podría poner la tierra y manipular esta, seguidamente se diseño otro cilindro con un radio de 0.5mm y una altura de 0.3mm en este cilindro se detendría mecánicamente el tejido y también sería sumergido.
4. Ahora necesitábamos crear un canal para que pasaran los fluidos y conectar ambos cilindros y crear la conexión para que tanto la tierra y el tejido estuvieran sumergidos y a la vez pudiéramos mover la punta del micromanipulador con un diámetro externo de 1.5mm. Para lo cual creamos 3 bloques más, el primero con dimensiones (46 x 6 x 3 mm) el segundo con dimensiones (20 x 2.5 x 3 mm) el último (2 x 8 x 3 mm) los 2 mm escogidos fueron para poder mover la punta de 1.5mm.
5. Finalmente unimos todas las figuras y las extruimos del rectángulo de tamaño del portaobjetos por medio de la operación de extracción del software comsol, finalmente la geometría (Imagen 18a y 18b) fue guardada y exportada en un archivo tipo .stl para ser impreso en 3D.
6. Una vez se finalizó la impresión de la cámara diseñada, esta fue montada en un portaobjetos con kola loka (Imagen 18c) de esta forma fue posible detener mecánicamente el tejido, así como sumergir este junto con la tierra y mover la punta del micromanipulador.



**c**

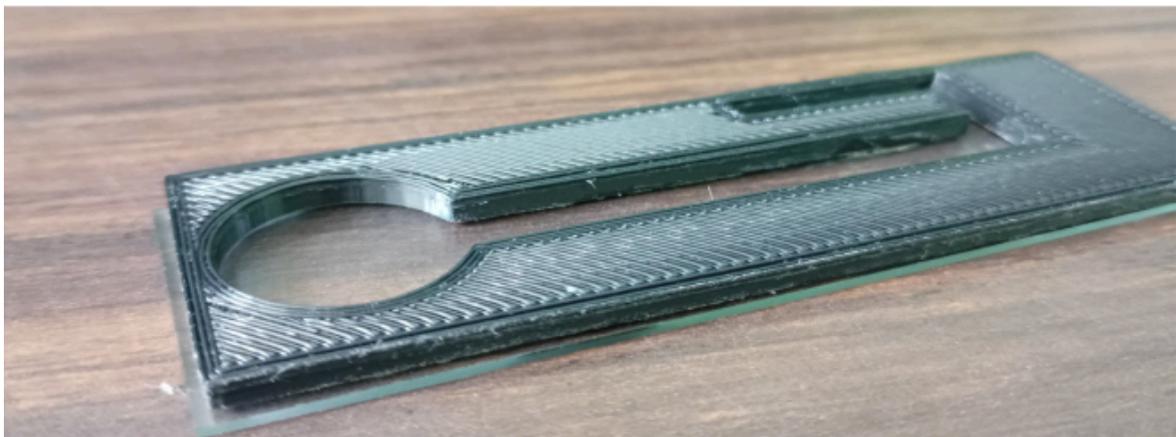


Imagen 18 a) Muestra el diseño de la cámara de registro electrofisiológico en el eje XY; b) Muestra la cámara en una vista 3D; c) Cámara de ya impresa y montada sobre un portaobjetos.

## Referencias

1. Wilson, C., & Chu, D. (Eds.). (2022). *The laboratory zebrafish*. CRC Press.
2. Lawrence, C. (2007). The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, 269(1-4), 1-20.
3. Bravo Espinoza, I., Olivares Romero, J. L., Medina Morales, D., & Aguirre Vidal, Y. (s.f.). *Pez cebra: la nueva rata de laboratorio*. Instituto de Ecología, A.C. Recuperado el 3 de agosto de 2025, de <https://www.inecol.mx/index.php/divulgacion/ciencia-hoy/pez-cebra-la-nueva-rata-de-laboratorio>
4. Seth, A., Stemple, D. L., & Barroso, I. (2013). The emerging use of zebrafish to model metabolic disease. *Disease models & mechanisms*, 6(5), 1080-1088.
5. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2001). *NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*. Diario Oficial de la Federación.
6. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2015). *NORMA Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014, Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres*. Diario Oficial de la Federación.
7. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales & Secretaría de Salud. (2002). *NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo*. Diario Oficial de la Federación.
8. Reed, B., & Jennings, M. (2011). Guidance on the housing and care of Zebrafish. *Southwater: Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals*.
9. American Veterinary Medical Association. (2020). *AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2020 edition*. Recuperado el 3 de agosto de 2025, de <https://www.avma.org/sites/default/files/2020-02/Guidelines-on-Euthanasia-2020.pdf>
10. Mocho, J. P., Collymore, C., Farmer, S. C., Leguay, E., Murray, K. N., & Pereira, N. (2022). FELASA-AALAS recommendations for monitoring and reporting of laboratory fish diseases and health status, with an emphasis on zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Medicine*, 72(3), 127-148.
11. Russell Wms, B., & Burch, R. L. (1959). The principles of humane experimental technique. *Special ed. South Mimms, Potters Bar, Herts, England: Universities Federation for Animal Welfare*, 165.

12. Lieschke, G. J., & Currie, P. D. (2007). Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature reviews genetics*, 8(5), 353-367.
13. Fenwick, N., Danielson, P., & Griffin, G. (2011). Survey of Canadian animal-based researchers' views on the Three Rs: replacement, reduction and refinement. *PloS one*, 6(8), e22478.
14. National Research Council. (2011). *Guide for the care and use of laboratory animals* (8th ed.). The National Academies Press. Recuperado el 3 de agosto de 2025, de <https://grants.nih.gov/grants/olaw/guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>
15. Avdesh, A., Chen, M., Martin-Iverson, M. T., Mondal, A., Ong, D., Rainey-Smith, S., ... & Martins, R. N. (2012). Regular care and maintenance of a zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: an introduction. *Journal of Visualized Experiments (JoVE)*, (69), e4196.
16. Matthews, M., & Varga, Z. M. (2012). Anesthesia and euthanasia in zebrafish. *ILAR journal*, 53(2), 192-204.
17. Nalle, S. E., Franse, K. F., & Kinkel, M. D. (2017). Analysis of pancreatic disease in zebrafish. *Methods in cell biology*, 138, 271-295.
18. Singleman, C., & Holtzman, N. G. (2011). Heart dissection in larval, juvenile and adult zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (55), 3165.
19. JoVE. (n.d.). *Zebrafish brain dissection: A technique of fish neurobiology* [Video]. *Journal of Visualized Experiments*. <https://www.jove.com/v/20201/zebrafish-brain-dissection-a-technique-of-fish-neurobiology>