

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias de la Salud**

**Manual para el manejo del pez cebra (*Danio rerio*) en  
laboratorios de investigación biomédica**

**Valeria Anabel Carvajal Mafla**

**Medicina Veterinaria**

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Médico Veterinario

Quito, 18 de mayo de 2022

# **UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias de la Salud**

## **HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

**Manual para el manejo del pez cebra (*Danio rerio*) en laboratorios de  
investigación biomédica**

**Valeria Anabel Carvajal Mafla**

**Nombre del profesor, Título académico**

**Lenin Vinueza, DMVZ, M.Sc**

Quito, 18 de mayo de 2022

## © DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Valeria Anabel Carvajal Mafla

Código: 00210419

Cédula de identidad: 0401502778

Lugar y fecha: Quito, 18 de mayo de 2022

## **ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN**

**Nota:** El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

## **UNPUBLISHED DOCUMENT**

**Note:** The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

## RESUMEN

El uso de animales como modelos experimentales se ha dado desde la antigüedad. Grandes filósofos consideraban que el desarrollo animal era un espejo del desarrollo humano. Los modelos animales han permitido la investigación de diversas patologías que afectan al ser humano. Los estudios realizados en peces cebra han incrementado debido a las características únicas y ventajosas de esta especie: pez pequeño, alta fecundidad, fertilización externa, rápido desarrollo, genoma completamente secuenciado y con gran similitud al genoma humano. Por esta razón esta especie se ha convertido en un modelo experimental, desplazando a otros modelos animales. El propósito de este trabajo es elaborar un manual para el manejo del pez cebra como modelo experimental en laboratorios de investigación biomédica. La recopilación de la información se llevó a cabo mediante motores de búsqueda y se seleccionó información científica relevante entre los años 2012 y 2022. Las fuentes recopiladas incluyen datos sobre la biología de la especie, condiciones de manejo, cuidados del pez cebra y manejo experimental que se detallan en el manual (Anexo A). Por lo que se concluyó que la información disponible sobre el pez cebra es accesible y permite la elaboración de un manual de manejo en laboratorios de investigación biomédica. La información científica disponible sobre el pez cebra es relevante; además, las investigaciones han ido incrementando en las últimas décadas por el interés que ha generado este modelo experimental.

**Palabras clave:** *Pez, cebra, Danio, rerio, modelo, experimental, manual, manejo, medicina, veterinaria.*

## ABSTRACT

The use of animals as experimental models has been given since antiquity. Great philosophers considered that animal development was a mirror of human development. Animal models have allowed the investigation of various pathologies that affect human beings. Studies on zebrafish have increased due to the unique and advantageous characteristics of this species: small fish, high fecundity, external fertilization, rapid development, fully sequenced genome and with great similarity to the human genome. For this reason, this species has become an experimental model, displacing other animal models. The purpose of this work is the elaboration of a manual for the management of zebrafish as an experimental model in biomedical research laboratories. The collection of information was carried out using search engines and relevant scientific information was selected between the years 2012 and 2022. The sources collected include data on the biology of the species, management conditions, zebrafish care and experimental management which are detailed in the management manual (Annex A). It is concluded that the available information on zebrafish is accessible and allows the development of a management manual for zebrafish in biomedical research laboratories. The scientific information available on zebrafish is relevant, and furthermore, research has been increasing in recent decades due to the interest generated by this experimental model.

**Key words:** *Zebrafish, Danio, rerio, experimental, model, management, manual, veterinary, medicine.*

**TABLA DE CONTENIDO**

Introducción .....	10
Desarrollo del Tema.....	12
Resultados de recopilación bibliográfica .....	12
Resultados para la elaboración del manual .....	14
Parámetros biológicos del pez cebra .....	14
Condiciones de manejo y cuidado del pez cebra .....	15
Manejo experimental del pez cebra.....	19
Discusión.....	21
Conclusiones .....	25
Referencias bibliográficas.....	27
Anexo A: Manual de manejo del pez cebra .....	31

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fuentes empleadas en cada variable según su año de publicación .....	13
Tabla 2. Parámetros fisiológicos normales del pez cebra .....	15
Tabla 3. Parámetros de agua requeridos para peces cebra en cautiverio .....	17
Tabla 4. Parámetros de iluminación para el pez cebra en cautiverio.....	17
Tabla 5. Requerimientos nutricionales del pez cebra .....	18
Tabla 6. Analgésicos utilizados en peces cebra .....	19
Tabla 7. Dosis y uso de anestésicos en peces cebra.....	20
Tabla 8. Métodos de eutanasia e indicadores de muerte en peces cebra .....	21

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Número de publicaciones empleadas por año de publicación.....	12
Figura 2. Número de publicaciones en base a las variables utilizadas .....	13
Figura 3. (A): Anatomía externa del pez cebra. (B): Anatomía interna del pez cebra .....	14
Figura 4. Estante individual de tanques con sistema de recirculación.....	16
Figura 5. Medidas de bioseguridad a seguir por el personal de laboratorio .....	18

## INTRODUCCIÓN

Los modelos animales son necesarios para la investigación biomédica, su uso provee desarrollo, fiabilidad y legitimidad de los ensayos científicos (Cartner et al., 2020; Roxo-Rosa et al., 2020). Los estudios realizados en pocos años con la ayuda del pez cebra como modelo abarcan desde el uso de células madre hasta cambios de comportamiento por el consumo de drogas (Harper & Lawrence, 2011).

El pez cebra es un pequeño pez de agua dulce originario de India, Nepal, Pakistán y el Sur de Asia. Pertenece a la familia *Cyprinidae*. Se cree que 1000 laboratorios alrededor del mundo manejan este modelo experimental, con un total de 5 millones de individuos en cautiverio (Roxo-Rosa et al., 2020; Stevens et al., 2021). Las ventajas más representativas de esta especie son: un genoma con gran similitud al genoma humano, fácil manipulación, alta fecundidad, fertilización externa, corto tiempo de desarrollo. De la misma manera gracias a la transparencia de sus células es posible visualizar las estructuras orgánicas durante el desarrollo embrionario (Chang et al., 2018; Teame et al., 2019). Además, el costo de las instalaciones para peces es menor en comparación con el costo de instalaciones para roedores (Detrich et al., 1998).

Varios libros e investigaciones hacen énfasis en la nutrición y calidad del agua, para un desarrollo físico y salud adecuada del pez cebra, ya que los resultados de la experimentación pueden variar por dichos factores, siendo indispensable la consideración de normas de bienestar animal en cada una de las etapas durante la experimentación (Teame et al., 2019).

La hipótesis planteada para el desarrollo de este trabajo fue si la información recopilada permitiría diseñar un manual de manejo del pez cebra (*Danio rerio*) como modelo experimental

en laboratorios de investigación biomédica, con base en esta premisa se planteó como objetivo principal elaborar un manual. Para cumplir con el objetivo se realizó una recopilación de información sobre el pez cebra entre los años 2012 y 2022 con el uso de palabras clave en español e inglés a través de motores de búsqueda. Se identificaron y clasificaron las publicaciones en base a variables correspondientes a los capítulos del manual. La elaboración de este manual (Anexo A) busca facilitar el manejo de *Danio rerio* dentro de laboratorios de investigación biomédica, así como las investigaciones donde se utilice este modelo animal.

## DESARROLLO DEL TEMA

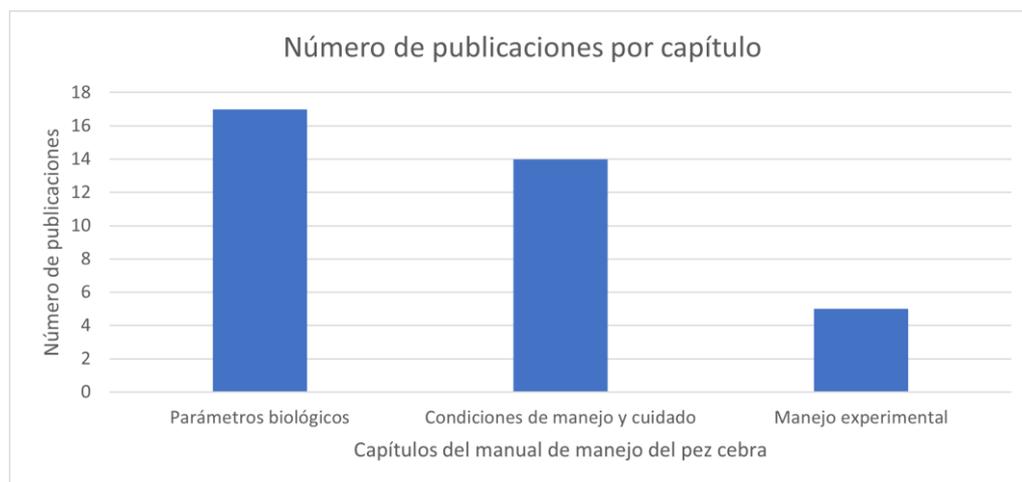
### Resultados de recopilación bibliográfica

En la Figura 1, se aprecia un incremento en las publicaciones sobre el pez cebra entre los años comprendidos entre 2008 y el 2022. Adicionalmente se observa un repunte de publicaciones en el año 2022 con 8 trabajos. La revista con mayor número de publicaciones fue Zebrafish con un total de 4 documentos científicos, mientras las demás revistas contaron con 1 publicación cada una.



**Figura 1.** Número de publicaciones empleadas por año de publicación

El siguiente resultado se obtuvo en base a las variables utilizadas, un total de 17 publicaciones para “Parámetros biológicos”, 14 documentos para “Condiciones de manejo y cuidado” y 5 fuentes para “Manejo experimental” como se aprecia en la Figura 2. En esta figura se evidencia una mayor disponibilidad de información sobre parámetros biológicos.



**Figura 2.** Número de publicaciones en base a las variables utilizadas

Otro de los resultados con relación al año de publicación, se pueden observar en la Tabla 1 una mayor cantidad de información en el año 2020 con 10 publicaciones para las 3 variables. Por otro lado, la información para las variables condiciones de manejo y manejo experimental, es limitada o ausente dependiendo del año de publicación como se observa en el año 2008 y 2011. Cabe recalcar que las divulgaciones disminuyen a 2 y 3 en el año 2021 y 2022 respectivamente.

**Tabla 1.** Fuentes empleadas en cada variable según su año de publicación

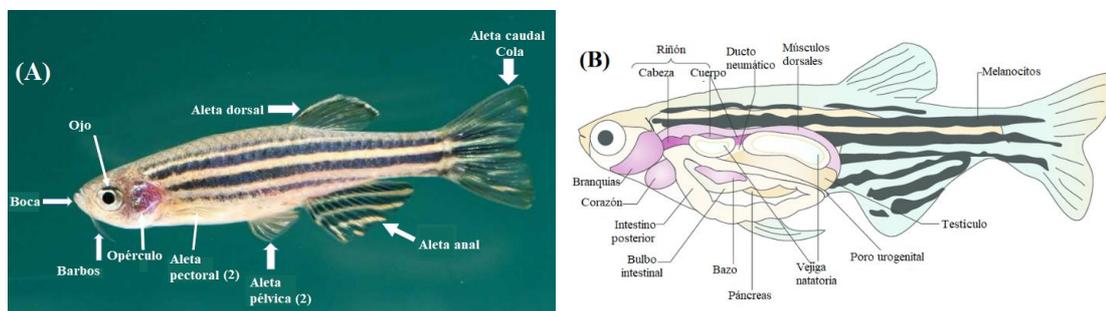
Año de publicación	Parámetros biológicos	Condiciones de manejo y cuidado	Manejo experimental
2008	1	-	-
2011	2	-	-
2012	-	1	-
2014	2	-	-
2015	-	1	1
2016	2	2	1
2017	2	1	-
2018	2	1	-
2019	1	1	-
2020	4	4	2
2021	-	1	1
2022	1	2	-

Fuente: Datos de la bibliografía recopilada en cada variable según su año de publicación.

## Resultados para la elaboración del manual

### *Parámetros biológicos del pez cebra*

La anatomía externa del pez cebra se divide en 3 partes: cabeza, tronco y cola, tiene un total de 7 aletas que incluyen: 2 pectorales, 2 pélvicas, 1 dorsal, 1 anal y 1 caudal como se observa en la Figura 3A. Sus orificios naturales son: boca, fosas nasales y poro urogenital. Esta especie presenta cavidad celómica, donde se alojan sus órganos internos (Figura 3B) (Cartner et al., 2020).



**Figura 3.** (A): Anatomía externa del pez cebra. (B): Anatomía interna del pez cebra. Figuras basados en (Cartner et al., 2020; Liu et al., 2016).

Esta especie alcanza su madurez sexual a los 3 meses post eclosión del huevo. Las hembras desovan de 200 a 300 huevos cada una y son fertilizados externamente por los machos. A las 72 horas eclosionan los huevos fertilizados dando paso a las larvas, mismas que alcanzan su pubertad a los 22 días. Pasados los 3 meses ya se consideran peces adultos y el tiempo de vida media de este pez en condiciones naturales es de 42 a 66 meses y dentro del laboratorio es de 18 a 24 meses (Cartner et al., 2020; Presslauer et al., 2017; Rasmussen et al., 2018; Reed & Jennings, 2011; Wang et al., 2022).

Los resultados obtenidos en la variable “Parámetros fisiológicos” fueron resumidos en la Tabla 2. Donde se refleja una mayor cantidad de información para las etapas adultas,

mientras que los datos en embriones y larvas es limitada. Por su parte, el parámetro de tamaño es el único que registra valores en las 3 etapas.

**Tabla 2. Parámetros fisiológicos normales del pez cebra**

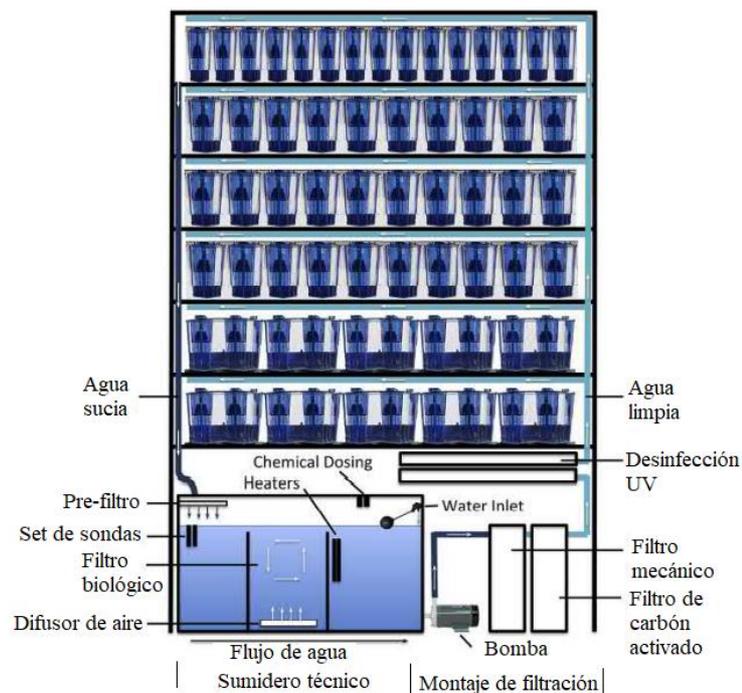
Parámetros fisiológicos	Embrión	Larva / Juvenil	Adulto	
			Macho	Hembra
Frecuencia cardíaca (lat/min)	120 – 180	*	*	
Frecuencia respiratoria (mov/min)	*	*	80 – 160	
Tamaño (mm)	3.5	4 – 18	30 – 40	
Peso (gr)	*	64 – 245	361.6	522,7
Volumen sanguíneo (uL)	*	*	20 – 25	
Hematocrito (%)	*	*	31.5 – 37.2	
Hemoglobina (gr/dL)	*	*	13.2	13.1
Glóbulos rojos (/uL)	*	*	80 x 1000	
Glóbulos blancos (/mm <sup>3</sup> )	*	*	3 x 10 <sup>6</sup>	
Glucosa (mg/dL)	*	*	82	

*Fuente: Valores de parámetros fisiológicos recopilados en las etapas de desarrollo de Danio rerio. \* Datos no reportados en la literatura empleada para este trabajo. Basado en (3Rs-Centre Utrecht Life Sciences, 2016; Benslimane et al., 2020; Cartner et al., 2020; Dabrowski & Miller, 2018; Delomas & Dabrowski, 2019; Shamsi et al., 2020; Singleman & Holtzman, 2014).*

### **Condiciones de manejo y cuidado del pez cebra**

Al incorporar estos peces al laboratorio, deben permanecer un tiempo mínimo de 2 semanas en cuarentena, se realiza una observación desde su arribo a las instalaciones y si se presenta alguna anomalía se debe proceder a su eutanasia. Sin embargo, los embriones con menos de 36 horas post fecundación pueden ser introducidos directamente al bioterio. Cabe mencionar que para identificar patologías en peces adultos se realizan pruebas PCR diagnósticas (Aleström et al., 2020; Murray et al., 2022; Zebrafish Husbandry Association, 2021).

Para el alojamiento se deben emplear tanques de vidrio o policarbonato con una altura máxima de 25 centímetros, por lo que se recomienda según estas dimensiones, una densidad poblacional de 1.5 a 3 peces por cada litro de agua (Aleström et al., 2020). Por su parte, en cuanto al manejo del agua, la mayoría de los laboratorios cuentan con sistemas de recirculación de agua como se aprecia en la Figura 4. Estos sistemas permiten la filtración y desinfección del agua mediante luz UV (Aleström et al., 2020; Lee et al., 2022; Tsang et al., 2020).



**Figura 4.** Estante individual de tanques con sistema de recirculación basado en (Cartner et al., 2020).

Un requisito en la calidad de agua es que no posea cloro. Además su temperatura ideal debe ser de 28 grados centígrados como se observa en la Tabla 3, pues el pez cebra puede sobrevivir en un rango de temperatura constante de 15 a 36 grados centígrados (Aleström et al., 2020; Avdesh et al., 2012; Lee et al., 2022).

**Tabla 3. Parámetros de agua requeridos para peces cebra en cautiverio**

Parámetro de agua	Valores
Temperatura (°C)	28 – 28.5
pH	6.8 – 8
Dureza (mg/L)	50 – 150
Conductividad (micro-Siemens/cm)	200 – 600
Salinidad (ppt)	0.25 – 0.75
Amoníaco (mg/L)	< 0.02
Nitritos (mg/L)	< 0.1
Nitratos (mg/L)	< 50
Oxígeno (mg/L)	> 7

*Fuente: Valores de referencia de los parámetros de agua necesarios para Danio rerio. Basado en (3Rs-Centre Utrecht Life Sciences, 2016; Aleström et al., 2020; Avdesh et al., 2012; Lee et al., 2022; Zebrafish Husbandry Association, 2021).*

El parámetro de luminosidad requiere luces fluorescentes con un fotoperiodo de 14 horas luz y 10 horas oscuridad. La transición luz-oscuridad debe darse en un tiempo de 30 minutos para simular el atardecer y la madrugada como se aprecia en la Tabla 4 (Kohale, 2015; Meyers, 2018; Tsang et al., 2017).

**Tabla 4. Parámetros de iluminación para el pez cebra en cautiverio**

Parámetros	Valores
Fotoperiodo (horas luz)	14
Fotoperiodo (horas oscuridad)	10
Tiempo de transición oscuridad-luz / luz oscuridad (minutos)	30
Luz fluorescente (lux)	54 – 334

*Fuente: Valores de parámetros de iluminación empleados en laboratorio. Basado en (Kohale, 2015; Meyers, 2018; Tsang et al., 2017).*

Adicionalmente se pueden implementar enriquecimientos físicos, nutricionales, sociales y sensoriales, como comida viva, a pesar de que su nutrición diaria se base en comida seca (Zebrafish Husbandry Association, 2021). La frecuencia con la que se debe alimentar a esta especie es de 2 a 3 veces al día. Sus requerimientos nutricionales se establecen por el porcentaje de su peso corporal: 50 a 300% en larvas y juveniles y 3 a 5% en adultos. Para una

adecuada nutrición del pez cebrá es necesario el aporte de proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas y minerales, los valores recomendados se presentan en la Tabla 5 (3Rs-Centre Utrecht Life Sciences, 2016; Aleström et al., 2020; Tsang et al., 2020; Zebrafish Husbandry Association, 2021).

**Tabla 5. Requerimientos nutricionales del pez cebrá**

Etapa de desarrollo	Proteínas (%)	Carbohidratos (%)	Lípidos (%)
Juvenil	60	5	10
Adulto	55	5	15

*Fuente: Requerimientos nutricionales en etapa adulta y juvenil del pez cebrá. Basado en (Zebrafish Husbandry Association, 2021).*

Otro factor importante para el cuidado de este pez es el estricto cumplimiento de protocolos de bioseguridad, sanidad e higiene por parte del personal de laboratorio y experimentación como se aprecia en la Figura 5 (Cartner et al., 2020).

MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Zapatos de uso exclusivo para el área de bioterio (desinfectar periódicamente)</li> <li>● Zapatos de uso exclusivo para cuarentena (desinfectar periódicamente)</li> <li>● Uso de zapatones o cobertores de zapatos</li> <li>● Bata de laboratorio</li> <li>● Guantes de manejo</li> <li>● Desinfección con solución de lejía 600 ppm 2 veces por semana</li> <li>● Alfombras adhesivas en todas las entradas</li> <li>● Equipos exclusivos para cada área</li> <li>● Sustituir peces cada 6-12 meses</li> <li>● Destinar tanques para desove (desinfectar después de cada uso)</li> <li>● Remover individuos enfermos o afectados</li> <li>● Realizar monitoreos de rutina de los equipos de calidad del agua</li> <li>● Desinfectar superficies de embriones nuevos con hipoclorito de sodio a 30 ppm durante 10 minutos</li> </ul>

**Figura 5. Medidas de bioseguridad a seguir por el personal de laboratorio. Basado en (Cartner et al., 2020; Murray et al., 2016).**

### *Manejo experimental del pez cebra*

Los signos de dolor en peces cebra son considerados para su manejo experimental. Por lo general se presenta un incremento en la frecuencia respiratoria, incremento o disminución del tiempo de nado, nado en el fondo del tanque y niveles elevados de cortisol. Para el manejo del dolor en esta especie se utilizan analgésicos: opioides, AINES y lidocaína. Los fármacos más utilizados se muestran en la Tabla 6 (Cartner et al., 2020; Ohnesorge et al., 2021).

**Tabla 6. Analgésicos utilizados en peces cebra**

<b>Fármaco</b>	<b>Dosis para larvas (inmersión)</b>	<b>Dosis y vía para adultos</b>
Morfina (opioide)	48 mg/L	5-8 mg/kg IP 2.5-5 mg/kg IM
Buprenorfina (opioide)	5 uM o 0.1 mg/L	-
Lidocaína (anestésico)	5 mg/L	1 mg/kg IM 2-5 mg/L inmersión 300 mg/L inmersión
Ácido acetil salicílico (AINE)	-	1-2.5 mg/L inmersión
Diclofenaco (AINE)	-	40 mg/kg IM
Indometacina (AINE)	-	5-20 uL IP

*Fuente: Fármacos analgésicos usados para el manejo de peces cebra. Vías de administración: IP: intraperitoneal. IM: intramuscular. Inmersión: sumergir animales en solución. Basado en (Ohnesorge et al., 2021).*

El anestésico general de preferencia para el pez cebra es el metasulfonato de triclaína o MS 222 y el anestésico local más utilizado es la lidocaína, las dosis de estos anestésicos se presentan en la Tabla 7, en la que se incluyen otros fármacos narcóticos (Cartner et al., 2020; Ohnesorge et al., 2021).

**Tabla 7. Dosis y uso de anestésicos en peces cebra**

<b>Fármaco</b>	<b>Dosis y uso</b>
MS 222 (Metasulfonato de tricaina)	50 mg/L sedación 50-100 mg/L anestesia leve 100-200 mg/L anestesia quirúrgica
Benzocaína	25-100 mg/L anestesia leve
2-Fenoxietanol	200-300 uL/L anestesia leve
Eugenol, isoeugenol y aceite de clavo	2-5 mg/L sedación 60-100 mg/L anestesia quirúrgica
Clorhidrato de metomidato	2-4 mg/L sedación 6-10 mg/L anestesia leve
Lidocaína	300 mg/L anestesia leve 325 mg/L anestesia quirúrgica
Hipotermia	12°C sedación 10°C anestesia leve 0-4°C anestesia

*Fuente: Anestésicos más utilizados en peces cebra. Basado en (Cartner et al., 2020).*

Los animales de experimentación deben someterse a eutanasia posterior a las investigaciones. Se conocen varios métodos de eutanasia para esta especie, estos se detallan en la Tabla 8. Se prefiere utilizar el método eutanásico físico de shock hipotérmico en el cual se disminuye la temperatura del agua entre 2 a 4 grados centígrados hasta conseguir la pérdida de movimiento del animal y de los movimientos operculares. La FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos) no ha aprobado todavía un fármaco para la eutanasia de animales acuáticos (American Veterinary Medical Association, 2020; Strykowski & Schech, 2015).

**Tabla 8. Métodos de eutanasia e indicadores de muerte en peces cebra**

Método	Descripción	Indicadores de muerte
Inmersión	<p>Sobredosis mediante inmersión en soluciones</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Benzocaína <math>\geq 250</math> mg/L</li> <li>• Dióxido de carbono</li> <li>• Etanol 10-30 mL 95%</li> <li>• Eugenol e isoeugenol 170 mg/L</li> <li>• Isoflurano y sevoflurano 5-20 mL/L</li> <li>• Sulfato de quinaldina <math>\geq 100</math> mg/L</li> <li>• Metasulfonato de tricaina 250-500 mg/L</li> <li>• Lidocaína 400 mg/L</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pérdida de movimiento</li> <li>• No reacción a estímulos</li> <li>• Flacidez inicial seguida de rigidez cadavérica</li> </ul>
Inyección	<p>Vía intracelómica, intracardiaca, intravenosa e intramuscular</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pentobarbital sódico 60-100 mg/kg</li> <li>• Ketamina (posterior a esto se aplica pentobarbital) 66-88 mg/kg</li> <li>• Ketamina + medetomidina (posterior a esto se aplica pentobarbital) 1-2 mg/kg ketamina + 0.05-0.1 mg/kg medetomidina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Arresto respiratorio (pérdida de movimientos operculares por al menos 30 minutos)</li> <li>• Pérdida de movimiento ocular</li> </ul>
Métodos físicos	<p>Realizados por personal entrenado y calificado</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Decapitación y descabezamiento</li> <li>• Transección cervical y descabezamiento</li> <li>• Traumatismo por objeto contundente</li> <li>• Maceración</li> <li>• Enfriamiento rápido (método más aceptado)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ausencia de latido cardíaco</li> </ul>

Fuente: Métodos de eutanasia para *Danio rerio*, vías de administración de fármacos, dosis eutanasicas. Basado en (American Veterinary Medical Association, 2020).

## Discusión

El objetivo general del presente trabajo fue laborar un manual para el manejo del pez cebra (*Danio rerio*) como modelo experimental en laboratorios de investigación biomédica (Anexo A). A partir de los resultados obtenidos se puede evidenciar que las investigaciones sobre esta especie han incrementado del 2008 hasta 2022, con un crecimiento considerable en el año 2020 (Figura 1), lo que manifiesta un interés en la utilización de este animal para investigaciones biomédicas.

De los 36 trabajos seleccionados mediante criterios de inclusión y exclusión, el 27.77% corresponde a modelos de experimentación in vivo, el 25% a revisiones de información, el 13.88% a libros, el 11.11% a modelos de experimentación in vitro, el 8.33% a protocolos, el 5.55% a páginas web, los porcentajes restantes incluyen 1 guía, 1 normativa y 1 ley con un valor del 2.7% cada uno. Demostrando un incremento en el número de investigaciones con modelos de experimentación in vivo y revisiones sistemáticas de información.

En la Figura 2 se aprecia una variación en la cantidad de fuentes por cada variable. Existe una mayor cantidad de información sobre los parámetros biológicos del pez cebra, esto puede deberse a las investigaciones sobre esta especie en estado salvaje. Los datos de manejo experimental de esta especie son limitados debido a que es un modelo experimental reciente.

En el año 2020 incrementa el número de publicaciones sobre el pez cebra (Tabla 1) en las 3 variables propuestas. Es posible que la emergencia sanitaria del COVID-19, incluyendo el aislamiento, haya interferido en el trabajo de los investigadores durante el tiempo de pandemia, reduciendo las publicaciones en los años 2021 y 2022.

Tanto la anatomía interna, como la externa del pez cebra están bien definidas (Imagen 1). No hay discrepancias en relación a la morfología de *Danio rerio* entre los autores analizados.

Por otro lado, los autores (de Luca et al., 2015; Dhillon et al., 2013; Maciag et al., 2022) coinciden en el valor de referencia de la frecuencia cardíaca del pez cebra en estado embrionario presentada en la Tabla 2. El autor (Santoso et al., 2020) propone un rango de 140 a 180 latidos por minuto. La información disponible de valores hematológicos del pez cebra es

limitada y no ha sido descrita por otros investigadores, es probable que esto se deba a la mínima cantidad de sangre que posee esta especie.

En cuanto a los parámetros de agua, los autores (Kohale, 2015) y (Marcon et al., 2018) concuerdan con (Cartner et al., 2020) en cuanto a las ventajas que aportan los sistemas de recirculación de agua (Imagen 2) empleados para el alojamiento de los peces cebra dentro de laboratorios de investigación, considerando características físicas, químicas y biológicas adecuadas para la supervivencia de estos peces.

Los valores de temperatura del agua para el pez cebra según (Aleström et al., 2020) varían de 24 a 29 grados centígrados, mientras (Hammer, 2020) considera un rango de 24 a 28 grados. Tanto (Hammer, 2020) y (Tsang et al., 2020) establecen que la temperatura ideal para el desarrollo del pez cebra es de 28 grados. Por su parte, el autor (Hammer, 2020) plantea que el pH del agua para el alojamiento de *Danio rerio* va de 7 a 8, mientras (Aleström et al., 2020) considera que el pH debe permanecer de 6.5 a 8. Los valores presentados en la (Tabla 3) fueron obtenidos a partir de los rangos presentados por varios autores.

Con respecto a los parámetros lumínicos, hay una concordancia en los valores de horas luz y horas de oscuridad dentro del laboratorio para el pez cebra (Tabla 4) entre los autores (Paredes et al., 2019) y (Yang et al., 2018), por otro lado (Aleström et al., 2020) considera un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad para un desarrollo adecuado de *Danio rerio*, aún así, es probable que una leve variación de los valores del fotoperiodo no sean relevantes dentro del laboratorio.

La información sobre los requerimientos nutricionales del pez cebra (Tabla 5) son limitados, por lo tanto, no se puede contrastar la información obtenida de (Zebrafish Husbandry

Association, 2021) con otros autores. Probablemente la ausencia de información sobre este tópico se deba a que se realizan más ensayos en modelos de experimentación tradicionales como ratones.

(Lieggi, 2020) al igual que (Murray et al., 2022) presentan las mismas consideraciones en cuanto a las medidas de bioseguridad (Figura 5) que deben cumplirse por el personal de laboratorio y bioterio para evitar la contaminación cruzada de un área a otra. Ambos autores plantean que el uso de zapatones, batas, guantes es fundamental para el manejo de estos peces, es posible que estas medidas de bioseguridad se sigan también en laboratorios con otros modelos de experimentación con la finalidad de mantener la sanidad e higiene.

En cuanto a los fármacos usados en este animal, según (Chatigny et al., 2018) los analgésicos empleados en peces cebra (Tabla 6) incluyen: buprenorfina, morfina, tramadol, lidocaína y AINES, por su parte (Collymore, 2020) establece el uso de lidocaína, aspirina y morfina. Estos autores concuerdan con (Ohnesorge et al., 2021) en el uso de varios fármacos para inducir analgesia en *Danio rerio*. Ninguno de estos autores plantea el por qué del uso de cada analgésico, es posible que estos se recomienden por la facilidad de administración, su costo o la disponibilidad en el mercado.

Tanto (Cartner et al., 2020) como (Collymore, 2020) indican que se puede emplear metasulfonato de triclaína, benzocaína, 2-fenoxietanol, lidocaína, eugenol, isoeugenol, aceite de clavo y metomidato como anestésicos para peces cebra (Tabla 7). Sin embargo, (Collymore, 2020) incluye también al propofol, ketamina e isoflurano como agentes anestésicos. Los autores mencionados no explican la razón ni los beneficios del uso de los anestésicos incluidos

en la (Tabla 7), es probable que los fármacos presentados se hayan considerado en base a su disponibilidad y su aplicación práctica para este pez.

Finalmente, los métodos de eutanasia (Tabla 8) propuestos para el pez cebra según (Collymore, 2020) se basan en sobredosis de anestésicos como: metasulfonato de triclaína, lidocaína, 2-fenoxietanol, eugenol, aceite de clavo e isoeugenol, por otro lado, plantea como método físico de eutanasia al shock hipotérmico, concordando con (American Veterinary Medical Association, 2020) en cuanto a su efectividad y facilidad de uso, además, presenta otros fármacos y métodos físicos para la muerte digna de este modelo experimental.

## CONCLUSIONES

En conclusión, se logró demostrar la hipótesis planteada. La información sobre el manejo de esta especie es accesible y permite la elaboración de un manual de manejo del pez cebra como modelo experimental en laboratorios de investigación biomédica (Anexo A). La metodología empleada para este trabajo fue eficaz y permitió lograr los objetivos de recopilación de información y elaboración del manual de manejo. Hay información relevante disponible sobre el manejo de estos animales y el número de investigaciones ha ido incrementando a lo largo de los años. Este pez se ha convertido en un organismo modelo por excelencia para la experimentación y el estudio de diversas patologías, gracias a las ventajas que provee frente a otros modelos animales. Sin embargo, no se dispone de información suficiente en las áreas de etología, parámetros fisiológicos normales en todas las etapas de desarrollo, enriquecimiento ambiental y escalas del dolor.

Se recomienda realizar investigaciones sobre la etología del pez cebra, escalas del dolor del animal, métodos de enriquecimiento ambiental y parámetros fisiológicos normales de la

especie con la finalidad de ampliar la información, mejorar el bienestar animal de los individuos utilizados para estos estudios y obtener resultados fiables en las investigaciones biomédicas. Finalmente se debe considerar un manejo de condiciones similares dentro de los laboratorios en cuanto alojamiento y alimentación, así como la inclusión de etogramas específicos para el pez cebra.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 3Rs-Centre Utrecht Life Sciences. (2016). *Puntos finales humanitarios en la experimentación animal*. Conducta y Fisiología Normal: Pez Cebra.
- Abdollahpour, H., Falahatkar, B., & Lawrence, C. (2020). El efecto del fotoperiodo en el crecimiento y rendimiento del desove del pez cebrá, *Danio rerio*. *Aquaculture Reports*, *17*, 100295. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100295>
- Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario. (2021). Resolución XX. In *Resolución XX*. Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario.
- Aleström, P., D'Angelo, L., Midtlyng, P. J., Schorderet, D. F., Schulte-Merker, S., Sohm, F., & Warner, S. (2020). Pez cebrá: recomendaciones de alojamiento y cría. *Laboratory Animals*, *54*(3), 213–224. <https://doi.org/10.1177/0023677219869037>
- American Veterinary Medical Association. (2020). *AVMA Directrices para la euanasia de animales: 2020 Edition*. AVMA.
- Asamblea Nacional del Ecuador. (2014). Ley Orgánica de Bienestar Animal. In *Ley Orgánica de Bienestar Animal*.
- Avdesh, A., Chen, M., Martin-Iverson, M. T., Mondal, A., Ong, D., Rainey-Smith, S., Taddei, K., Lardelli, M., Groth, D. M., Verdile, G., & Martins, R. N. (2012). Cuidado y mantenimiento regular de un laboratorio de pez cebrá (*Danio rerio*): Una introducción. *Journal of Visualized Experiments*, *69*. <https://doi.org/10.3791/4196>
- Benslimane, F. M., Zakaria, Z. Z., Shurbaji, S., Abdelrasool, M. K. A., Al-Badr, M. A. H. I., al Absi, E. S. K., & Yalcin, H. C. (2020). Evaluación de la función cardíaca y hemodinámica del flujo sanguíneo en el pez cebrá (*Danio rerio*) mediante videomicroscopía de alta velocidad. *Micron*, *136*, 102876. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2020.102876>
- Cartner, S., Eisen, J., Farmer, S., Guillemín, K., Kent, M., & Sanders, G. (2020). El pez cebrá en la investigación biomédica, biología, cría, enfermedades y aplicaciones de investigación. En *Risk-based Energy Management*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817491-3.00014-3>
- Chang, Z., Chen, P.-Y., Chuang, Y.-J., & Akhtar, R. (2018). El pez cebrá como modelo para estudiar la maduración ósea: Caracterización estructural y mecánica a nanoescala de los cambios relacionados con la edad en la columna vertebral del pez cebrá. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, *84*, 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.05.004>
- Chatigny, F., Creighton, C., & Stevens, E. D. (2018). Revisión actualizada de la analgesia en peces. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, *57*, 5–12.
- Collymore, C. (2020). Anestesia, analgesia y eutanasia del pez cebrá de laboratorio. En *The Zebrafish in Biomedical Research* (pp. 403–413). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812431-4.00034-8>

- Dabrowski, K., & Miller, M. (2018). Paradigma controvertido en la cría del pez cebra (*Danio rerio*). *Zebrafish*, *15*(3), 295–309. <https://doi.org/10.1089/zeb.2017.1515>
- de Luca, E., Zaccaria, G. M., Hadhoud, M., Rizzo, G., Ponzini, R., Morbiducci, U., & Santoro, M. M. (2015). ZebraBeat: una plataforma flexible para el análisis de la frecuencia cardíaca en embriones de pez cebra. *Scientific Reports*, *4*(1), 4898. <https://doi.org/10.1038/srep04898>
- Delomas, T. A., & Dabrowski, K. (2019). Protocolo mejorado para el crecimiento rápido del pez cebra sin reducir el rendimiento reproductivo. *Aquaculture Research*, *50*(2), 457–463. <https://doi.org/10.1111/are.13912>
- Detrich, H. W., Westerfield, M., & Zon, L. I. (1998). *Capítulo 1 Visión general del sistema del pez cebra* (pp. 3–10). [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)61816-6](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)61816-6)
- Dhillon, S. S., Dóro, É., Magyary, I., Egginton, S., Sík, A., & Müller, F. (2013). Optimización de la medición del ECG embrionario y larvario en el pez cebra para cuantificar el efecto de los fármacos que prolongan el QT. *PLoS ONE*, *8*(4), e60552. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060552>
- Hammer, H. S. (2020). Calidad del agua para el cultivo del pez cebra. In *The Zebrafish in Biomedical Research* (pp. 321–335). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812431-4.00029-4>
- Harper, C., & Lawrence, C. (2011). *El pez cebra de laboratorio*. Taylor and Francis Group.
- Kohale, K. (2015). Cría de pez cebra en un entorno de laboratorio en el TIFR. *Journal of Laboratory Animal Science*, *3*(1).
- Lara, R. A., & Vasconcelos, R. O. (2019). Caracterización del paisaje sonoro natural del pez cebra y comparación con las condiciones de ruido en cautividad. *Zebrafish*, *16*(2), 152–164. <https://doi.org/10.1089/zeb.2018.1654>
- Lee, C. J., Paull, G. C., & Tyler, C. R. (2022). Mejorar el bienestar del pez cebra en el laboratorio y la investigación científica mediante la comprensión de su historia natural. *Biological Reviews*. <https://doi.org/10.1111/brv.12831>
- Lieggi, C. (2020). Importación y cuarentena. In *The Zebrafish in Biomedical Research* (pp. 431–442). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812431-4.00036-1>
- Liu, Y., Li, D., & Yuan, Z. (2016). Imágenes de tomografía fotoacústica del pez cebra adulto mediante el uso de transductores de ultrasonido de alta frecuencia desenfocados y enfocados. *Applied Sciences*, *6*(12), 392. <https://doi.org/10.3390/app6120392>
- Maciag, M., Wnorowski, A., Mierzejewska, M., & Plazinska, A. (2022). Evaluación farmacológica de modelos de cardiotoxicidad basados en el pez cebra. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *148*, 112695. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112695>
- Marcon, M., Mocelin, R., Sachett, A., Siebel, A. M., Herrmann, A. P., & Piato, A. (2018). El entorno enriquecido previene el estrés oxidativo en el pez cebra sometido a un estrés crónico imprevisible. *PeerJ*, *6*, e5136. <https://doi.org/10.7717/peerj.5136>

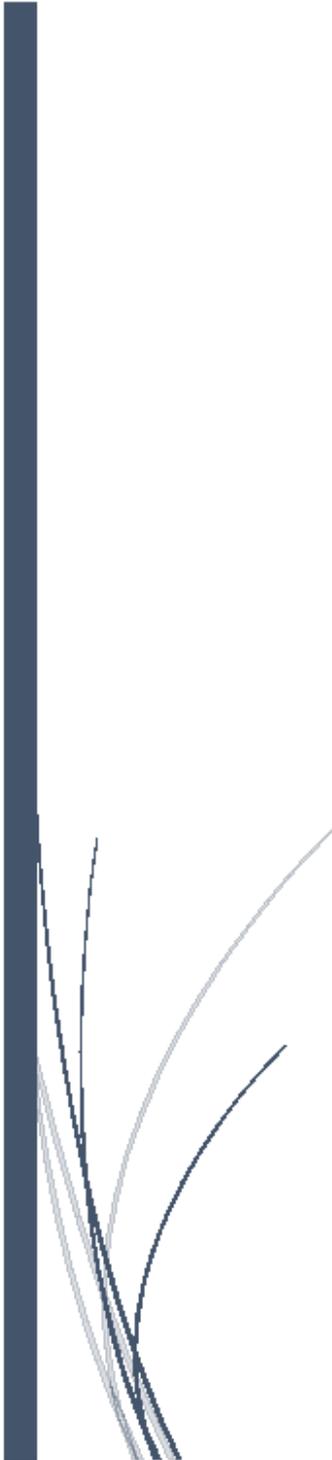
- Meyers, J. R. (2018). El pez cebra: Desarrollo de un organismo modelo vertebrado. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 16(1), e19. <https://doi.org/10.1002/cpet.19>
- Murray, K. N., Clark, T. S., Kebus, M. J., & Kent, M. L. (2022). Libre de patógenos específicos - Una revisión de las estrategias en la agricultura, la acuicultura y los mamíferos de laboratorio y cómo informan las nuevas recomendaciones para el pez cebra de laboratorio. *Research in Veterinary Science*, 142, 78–93. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.11.005>
- Murray, K. N., Varga, Z. M., & Kent, M. L. (2016). Bioseguridad y control sanitario en el Centro Internacional de Recursos del Pez Cebra. *Zebrafish*, 13(S1), S-30-S-38. <https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1206>
- Ohnesorge, N., Heintl, C., & Lewejohann, L. (2021). Métodos actuales para investigar la nocicepción y el dolor en el pez cebra. *Frontiers in Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.632634>
- Paredes, J. F., Cowan, M., López-Olmeda, J. F., Muñoz-Cueto, J. A., & Sánchez-Vázquez, F. J. (2019). Ritmos diarios de expresión de los genes reproductivos a lo largo del eje cerebro-hipófisis-gónadas y del hígado del pez cebra. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 231, 158–169. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.02.017>
- Presslauer, C., Tilahun Bizuayehu, T., Kopp, M., Fernandes, J. M. O., & Babiak, I. (2017). Dinámica del transcriptoma del miRNA durante el desarrollo gonadal del pez cebra. *Scientific Reports*, 7(1), 43850. <https://doi.org/10.1038/srep43850>
- Rasmussen, J. P., Vo, N.-T., & Sagasti, A. (2018). Las escamas de los peces dictan el patrón de innervación y vascularización de la piel adulta. *Developmental Cell*, 46(3), 344-359.e4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.06.019>
- Reed, B., & Jennings, M. (2011). *Guía para el alojamiento y cuidado del pez cebra Danio rerio*. RSPCA .
- Ribas, L., & Piferrer, F. (2014). El pez cebra (*Danio rerio*) como organismo modelo, con énfasis en las aplicaciones para la investigación de la acuicultura de peces de aleta. *Reviews in Aquaculture*, 6(4), 209–240. <https://doi.org/10.1111/raq.12041>
- Roxo-Rosa, M., Lopes, S., Tavares Carvalho, J. C., Solis Murgas, L. D., Jakhmola-Mani, R., Pande Katara, D., Mittal, K., & Bozkurt, Y. (2020). *El pez cebra en la investigación biomédica* (Y. Bozkurt, Ed.). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.82977>
- Santoso, F., Farhan, A., Castillo, A. L., Malhotra, N., Saputra, F., Kurnia, K. A., Chen, K. H.-C., Huang, J.-C., Chen, J.-R., & Hsiao, C.-D. (2020). Una visión general de los métodos de detección del ritmo cardíaco en el pez cebra. *Biomedicines*, 8(9), 329. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8090329>
- Shamsi, S., Alagan, A. A., Sarchio, S. N. E., & Md Yasin, F. (2020). Síntesis, caracterización y evaluación de la toxicidad del óxido de grafeno funcionalizado con plurónico F127 en el desarrollo embrionario del pez cebra (*Danio rerio*). *International Journal of Nanomedicine*, Volume 15, 8311–8329. <https://doi.org/10.2147/IJN.S271159>

- Singleman, C., & Holtzman, N. G. (2014). Crecimiento y maduración del pez cebra, *Danio Rerio*: Una herramienta de puesta en escena para la enseñanza y la investigación. *Zebrafish*, *11*(4), 396–406. <https://doi.org/10.1089/zeb.2014.0976>
- Spence, R., & Smith, C. (2008). Preferencia de color innata y aprendida en el pez cebra *Danio rerio*. *Ethology*, *114*(6), 582–588. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2008.01515.x>
- Stevens, C. H., Reed, B. T., & Hawkins, P. (2021). Enriquecimiento para el pez cebra de laboratorio: una revisión de las pruebas y los desafíos. In *Animals* (Vol. 11, Issue 3, pp. 1–22). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ani11030698>
- Strykowski, J. L., & Schech, J. M. (2015). Eficacia de los métodos de eutanasia recomendados en las larvas de pez cebra (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*, *54*(1), 81–84. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25651096>
- Teame, T., Zhang, Z., Ran, C., Zhang, H., Yang, Y., Ding, Q., Xie, M., Gao, C., Ye, Y., Duan, M., & Zhou, Z. (2019). El uso del pez cebra (*Danio rerio*) como modelo biomédico. *Animal Frontiers*, *9*(3), 68–77. <https://doi.org/10.1093/af/vfz020>
- Tsang, B., Ansari, R., & Gerlai, R. T. (2020). Mantenimiento y cría del pez cebra, teniendo en cuenta algunas consideraciones etológicas y ecológicas. In *Behavioral and Neural Genetics of Zebrafish* (pp. 17–32). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817528-6.00002-4>
- Tsang, B., Zahid, H., Ansari, R., Lee, R. C.-Y., Partap, A., & Gerlai, R. (2017). La cría del pez cebra: Una revisión de los diferentes métodos y una discusión sobre la estandarización. *Zebrafish*, *14*(6), 561–573. <https://doi.org/10.1089/zeb.2017.1477>
- Wang, Z., Zhao, H., Xu, Y., Zhao, J., Song, Z., Bi, Y., Li, Y., Lan, X., Pan, C., Foulkes, N. S., & Zhang, S. (2022). La exposición al plomo en las primeras etapas de la vida induce una toxicidad a largo plazo en el sistema nervioso central: De las larvas de pez cebra a los juveniles y adultos. *Science of The Total Environment*, *804*, 150185. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150185>
- Yang, X., Yang, Q., Zheng, G., Han, S., Zhao, F., Hu, Q., & Fu, Z. (2018). Neurotoxicidad e inmunotoxicidad en el desarrollo inducidas por el óxido de grafeno en embriones de pez cebra. *Environmental Toxicology*, *tox.22695*. <https://doi.org/10.1002/tox.22695>
- Zebrafish Husbandry Association. (2021). *Zebrafish Husbandry Association*. Conceptos básicos del pez cebra.

**ANEXO A: MANUAL DE MANEJO DEL PEZ CEBRA**

# Manual de manejo del pez cebra

Modelo experimental dentro del  
laboratorio



Valeria Carvajal Mafla  
Mayo - 2022

## Índice de contenido

Introducción .....	1
Parámetros biológicos del pez cebra .....	3
Anatomía .....	3
Ciclo vital y reproductivo.....	4
Etología .....	5
Parámetros fisiológicos normales .....	6
Condiciones de manejo y cuidado del pez cebra .....	7
Admisión .....	7
A. Cuarentena.....	7
B. Evaluación.....	8
Alojamiento.....	8
A. Tanques o peceras.....	8
B. Parámetros de agua.....	10
C. Iluminación y ruido.....	12
D. Enriquecimiento ambiental.....	13
Alimentación.....	15
Bioseguridad, sanidad e higiene.....	17
Transporte animal.....	19
Manejo experimental del pez cebra .....	20
Reconocimiento del dolor y angustia.....	20
Anestesia y analgesia .....	21
Eutanasia .....	23
Referencias bibliográficas.....	25

## INTRODUCCIÓN

El mundo científico ha estudiado el desarrollo humano y animal a lo largo de los años, grandes personajes han marcado la historia médica desde la antigüedad: Hipócrates, Aristóteles, y Leonardo Da Vinci, quienes consideraban que el desarrollo de otros animales podría ser un espejo del desarrollo humano (Cartner et al., 2020).

La experimentación con animales continúa dándose en la actualidad, a pesar de que se han cambiado por modelos alternativos, los modelos animales son elementales para la investigación biomédica enfocada a comprender patologías en el ser humano sin generar daños en el mismo, además el uso de animales provee desarrollo, fiabilidad y legitimidad de los estudios científicos (Roxo-Rosa et al., 2020).

Se han investigado varios tópicos mediante el uso de peces cebra, principalmente enfermedades humanas, infecciosas, cardiovasculares, hematopoyéticas, renales, musculares, digestivas, diabetes, ceguera, sordera, cáncer, desórdenes neurales y temas de acuicultura (Roxo-Rosa et al., 2020).

El pez cebra es un pequeño pez de agua dulce originario de India, Nepal, Pakistán y el Sur de Asia. Perteneció a la familia *Cyprinidae*, su nombre científico inicialmente fue *Brachydanio rerio*, cambiando a *Danio rerio* en 1981 cuando se descubrieron diferencias en estas dos especies (Roxo-Rosa et al., 2020).

*Danio rerio* se ha convertido en las últimas décadas en una especie de laboratorio muy utilizada en diversas áreas de investigación, más de 1000 laboratorios alrededor del mundo manejan esta especie y se cree que en total suman 5 millones de individuos en cautiverio (Stevens et al., 2021).

El pez cebra se ha convertido en un organismo modelo por excelencia para el estudio biológico de vertebrados y la modelización de enfermedades humanas. Las ventajas más representativas del uso de esta especie son: su genoma totalmente secuenciado con gran similitud al genoma del ser humano, la fácil manipulación del mismo, su alta fecundidad, fertilización externa y corto tiempo de desarrollo. El embrión se ha formado a las 24 horas post fecundación, al ser transparente permite el estudio de etapas del desarrollo desde la embriogénesis; a las 48 horas post fecundación ya se encuentran formados órganos completos como el corazón, los vasos sanguíneos y el intestino (Chang et al., 2018; Teame et al., 2019).

Existe una gran cantidad de cepas disponibles para experimentación, las más empleadas en investigaciones biomédicas son: AB, Ekkwill, Tubingen, Nadia y Cariotipo Indio Salvaje. Estos animales pueden mantenerse en espacios relativamente pequeños dentro del laboratorio y se estima que al menos 800 laboratorios a nivel mundial realizan experimentación con esta especie (Teame et al., 2019).

La Ley Orgánica de Bienestar Animal establece los fundamentos científicos para la protección animal, prevenir el sufrimiento, precautelarse la salud pública y evitar la violencia. Los animales sienten miedo, estrés, dolor, ansiedad, placer, felicidad y empatía, en muchos casos en igual medida que los seres humanos, razón suficiente para darles un trato ético (Asamblea Nacional del Ecuador, 2014).

Toda Institución de Educación Superior que cuente con Institutos de Investigación debe crear un Comité Bioético para reglamentar y controlar la experimentación animal siguiendo protocolos de bienestar animal. La eutanasia es el único método aprobado para

provocar la muerte de un animal que no será destinado al consumo humano (Asamblea Nacional del Ecuador, 2014).

La Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario – Agrocalidad en la Resolución XX establece una normativa para la conformación de Comités de ética, quienes estarán a cargo de aprobar los estudios que involucren el uso de animales, siempre y cuando sea de relevancia científica, además, del registro de bioterios, con la finalidad de garantizar un trato humanitario con todas las condiciones de bienestar animal y reducir el número de animales al mínimo necesario para las investigaciones (Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario, 2021).

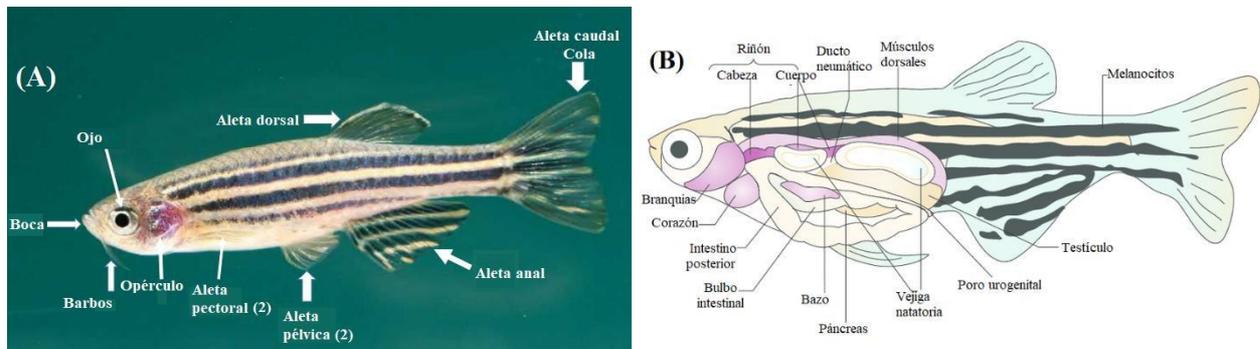
## **PARÁMETROS BIOLÓGICOS DEL PEZ CEBRA**

### **Anatomía**

La anatomía externa del pez cebra se divide en 3 partes: cabeza, tronco y cola del animal, se caracteriza por presentar líneas longitudinales de color oscuro y claro, además de una cobertura mucosa que mantiene la piel libre de patógenos. Esta especie tiene forma fusiforme, su cabeza es pequeña comparada con el tronco, presenta un estrechamiento desde la cabeza hasta el tronco y desde el tronco hasta la cola (Cartner et al., 2020).

Los orificios naturales de este pez son la boca, fosas nasales y ano que incluye la parte urogenital. Además, presenta celoma que contiene los órganos internos, el celoma es recubierto por una capa peritoneal pigmentada. Posee sistema cardiovascular, endócrino, digestivo, renal, reproductivo, músculo esquelético y hematopoyético; el sistema respiratorio es externo y craneal al celoma (Cartner et al., 2020).

Los órganos de los sentidos asociados a la cabeza son los ojos, las fosas nasales y los barbos, asociados a la visión y a la quimio recepción. En cuanto al oído, únicamente presentan oído interno. Tiene 1 par de aletas pectorales y pélvicas, 1 aleta dorsal, anal y caudal (Cartner et al., 2020).



**Imagen 1.** (A): Anatomía externa del pez cebra. (B): Anatomía interna del pez cebra. Basado en (Cartner et al., 2020; Liu et al., 2016).

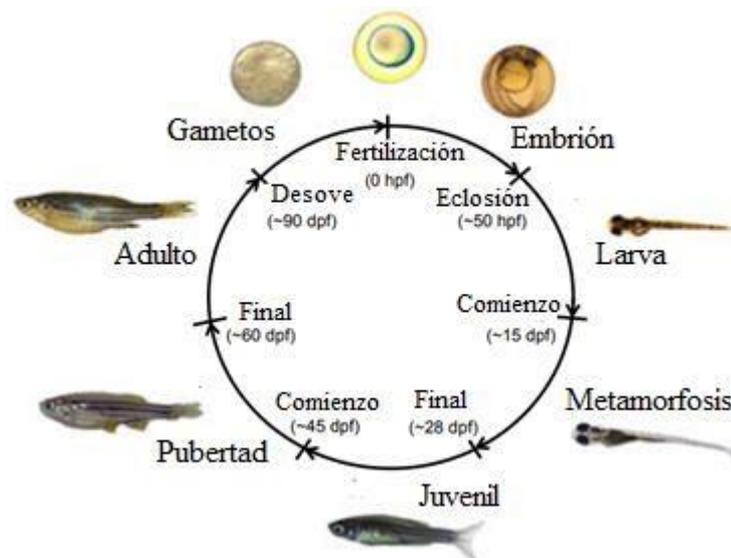
### Ciclo vital y reproductivo

Los peces cebra alcanzan su madurez sexual a los 3 meses de edad. Las hembras desovan en grupo, cada una realiza la ovoposición de alrededor de 200 a 300 huevos, que son fertilizados externamente por los machos. Los huevos eclosionan 3 días después dando paso a larvas; a los 2230 días alcanzan la pubertad o etapa juvenil y sus tejidos pasan por un proceso de transición de la infancia a la adultez; finalmente a los 90-120 días ya se consideran adultos, su madurez completa llega a los 6 meses (Cartner et al., 2020; Presslauer et al., 2017; Rasmussen et al., 2018; Wang et al., 2022).

Se cree que los machos pueden reconocer a las hembras al momento de elegir una pareja por medio de señales visuales. Los machos son territoriales y lo demuestran con la erección de sus aletas y movimientos danzantes. La agresión entre machos afecta

negativamente el proceso de ovoposición de las hembras que se da en un corto periodo de tiempo de madrugada (Tsang et al., 2017, 2020),

La esperanza de vida de un pez cebra en vida silvestre es de 42 a 66 meses, algunas cepas endogámicas tienen una esperanza de vida de 31 a 45 meses y el tiempo máximo de vida en el laboratorio varía de 18 a 24 meses debido a que sus condiciones reproductivas disminuyen (Cartner et al., 2020; Reed & Jennings, 2011).



**Imagen 2.** Representación del ciclo vital del pez cebra. hpf: horas post fertilización, dpf: días post fertilización. Basado en (Ribas & Piferrer, 2014).

### **Etología**

*Danio rerio* es un pez ciprínido de actividad diurna, estos peces se reúnen en grupos de acuerdo a preferencias sociales con sus congéneres. La formación de un cardumen es una estrategia útil contra depredadores, ante los cuales, el pez cebra muestra señales de alarma, reacciones de sobresalto y zigzagueo (Tsang et al., 2020).

Estos peces poseen sentidos desarrollados: visión, gusto, oído, olfato, tacto y balance. Son depredadores visuales y se alimentan de pequeños insectos en la superficie del agua,

aunque tienen preferencia por los micro-crustáceos y sus tonalidades rojas, lo que implica una dieta rica en carotenoides en vida libre (Cartner et al., 2020; Reed & Jennings, 2011; Spence & Smith, 2008).

Las hembras tienen una preferencia hacia los bancos de peces más numerosos, debido a que buscan protección, mientras los machos preferirán bancos con mayor número de hembras presentes. El tamaño óptimo del cardumen no se ha estudiado sistemáticamente (Tsang et al., 2017).

### Parámetros fisiológicos normales

**Tabla 1.** Valores de parámetros fisiológicos normales en el pez cebra

Parámetros fisiológicos	Embrión	Larva / Juvenil	Adulto	
			Macho	Hembra
Frecuencia cardíaca (lat/min)	120 – 180	*	*	
Frecuencia respiratoria (mov/min)	*	*	80 – 160	
Tamaño (mm)	3.5	4 – 18	30 – 40	
Peso (gr)	*	64 – 245	361.6	522,7
Volumen sanguíneo (uL)	*	*	20 – 25	
Hematocrito (%)	*	*	31.5 – 37.2	
Hemoglobina (gr/dL)	*	*	13.2	13.1
Glóbulos rojos (/uL)	*	*	80 x 1000	
Glóbulos blancos (/mm <sup>3</sup> )	*	*	3 x 10 <sup>6</sup>	
Glucosa (mg/dL)	*	*	82	

*Fuente:* \* Datos no reportados en la literatura empleada para este trabajo. Basado en (3Rs-Centre Utrecht Life Sciences, 2016; Benslimane et al., 2020; Cartner et al., 2020; Dabrowski & Miller, 2018; Delomas & Dabrowski, 2019; Shamsi et al., 2020; Singleman & Holtzman, 2014).

La frecuencia cardíaca puede evaluarse mediante la observación directa de los latidos cardíacos en los embriones del pez cebra gracias a su transparencia y la frecuencia respiratoria se mide contando los movimientos operculares de los individuos (Harper & Lawrence, 2011).

## **CONDICIONES DE MANEJO Y CUIDADO DEL PEZ CEBRA**

### **Admisión**

#### ***A. Cuarentena***

Todo animal, independiente de su etapa de desarrollo, debe pasar por un tiempo de cuarentena en peceras específicamente diseñadas para este propósito ubicadas en una habitación externa al bioterio. El cumplimiento a cabalidad, de un procedimiento de cuarentena reduce el riesgo de introducción de patógenos provenientes de otras instalaciones como: bacterias, virus, parásitos, moluscos y algas (Murray et al., 2022).

Únicamente los embriones con menos de 36 horas de fecundación pueden ser introducidos directamente en las instalaciones del bioterio, caso contrario, deberán criarse en la zona de cuarentena. Cuando los animales en cuarentena llegan a su etapa adulta, se pueden obtener embriones para introducirse en el sistema principal hasta conseguir una línea en el bioterio (Zebrafish Husbandry Association, 2021).

El ingreso y salida de personal de la zona de cuarentena debe ser mínimo. Para ingresar al área principal o de cuarentena se debe cumplir con el uso de bata de laboratorio, zapatones, gorro quirúrgico, guantes de examinación y de ser posible lavarse las manos con clorhexidina jabonosa al ingresar y al salir de las instalaciones (Zebrafish Husbandry Association, 2021).

## ***B. Evaluación***

Los nuevos individuos deben examinarse visualmente al momento de su llegada, si alguno aparenta estar enfermo, no debe introducirse en la instalación y tampoco en el área de cuarentena, por lo que se procede a la eutanasia. Se debe permitir que los peces se adapten a la temperatura para ser transferidos al tanque de recepción con la ayuda de una red, sin transferir el agua de transporte contaminada. La vigilancia de los nuevos individuos se realiza durante al menos 2 semanas (Aleström et al., 2020).

Se deben realizar pruebas diagnósticas para determinar la presencia de patógenos en los nuevos animales. Los individuos deben estar libres de enfermedades durante 3 generaciones para ser introducidos a las instalaciones principales del bioterio. Por lo general se realizan pruebas PCR para la identificación de los patógenos más reportados en el pez cebra (Murray et al., 2022).

## **Alojamiento**

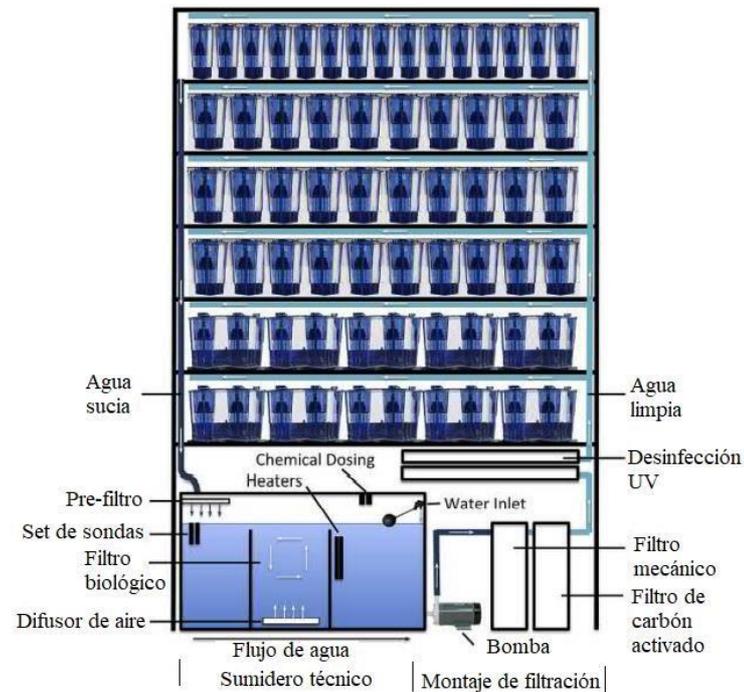
### ***A. Tanques o peceras***

Se emplean tanques de vidrio o policarbonato integrados con sistemas de filtrado y desinfección que deben estar ubicados en cuartos sin ventanas o entradas de luz. Los sistemas de recirculación poseen bombas que introducen una cantidad de agua determinada en las peceras, provocando un desbordamiento que elimina una cantidad igual de agua, además de filtrar restos de alimento y desechos. La principal ventaja del sistema de flujo es la prevención de enfermedades, pues reducen el riesgo de contaminación (Aleström et al., 2020).

Estos sistemas de recirculación son semiautónomos, permiten la filtración y desinfección del agua por medio de sistemas químicos, mecánicos, biológicos, desinfección con luz UV y cambio diario de agua, así se maximiza el número de peces, minimizando las operaciones y las emisiones de gases de efecto invernadero (Tsang et al., 2020).

En su hábitat natural el pez cebra nada en las superficies, por lo que la altura de las peceras debe alcanzar un máximo de 25 cm, además, el pez experimenta condiciones variables en el agua debido a la dinámica estacional, contrario a lo que ocurre dentro de los laboratorios, donde se controlan y monitorean estas condiciones para mantener la estabilidad durante todo el año (Lee et al., 2022).

Los espacios excesivamente pequeños son perjudiciales, pues no pueden desempeñar nado rápido, por otro lado, una alta densidad poblacional provoca competencia por alimento, niveles elevados de desechos orgánicos, fluctuaciones de pH y salinidad en los tanques individuales. Se conoce que los peces cebra son sociales, sin embargo, estudios confieren que el aislamiento crónico en peces cebra adultos disminuye los niveles de ansiedad y cortisol, por lo que un bajo número de peces por tanque es ideal (Tsang et al., 2020).



**Imagen 3.** Estante individual de tanques con sistema de recirculación. Basado en (Cartner et al., 2020).

Lo habitual en los laboratorios es alojar grupos de 10 a 50 peces en tanques de 2.5 a 10 litros de capacidad, aunque esto se considera poco natural, por lo que se recomienda una densidad de 1.5 a 3 peces por litro de agua (Tsang et al., 2020).

**Tabla 2.** Cantidad de peces cebra recomendados por cada litro de agua

Etapa de desarrollo	Cantidad de agua (litros)	Cantidad de individuos
Larvas	1	1.5 - 3
Adultos	1	10 - 30

Fuente: Tabla basada en (Tsang et al., 2017, 2020).

### B. Parámetros de agua

Los peces cebra son sensibles al agua de mala calidad y a los contaminantes. Lo ideal es no mantener a los peces en tanques estáticos durante un largo periodo de tiempo, ya que la

calidad del agua disminuye y se requiere cumplir con parámetros de calidad aceptable para sustentar una actividad y fisiología normal. La físicoquímica del agua es fundamental para el bienestar del pez cebra ya que si el agua no permanece limpia los peces corren el riesgo de intoxicación por sus propios desechos: amoníaco y amonio (Lee et al., 2022).

El agua debe ser desclorada por al menos 48 horas para su uso en las peceras, esta puede mantenerse en depósitos con bombas de circulación que mantienen la temperatura y aceleran la descloración (Avdesh et al., 2012).

**Tabla 3.** *Parámetros de agua requeridos para peces cebra en cautiverio*

<b>Parámetro de agua</b>	<b>Valores</b>
Temperatura (°C)	28 – 28.5
pH	6.8 – 8
Dureza (mg/L)	50 – 150
Conductividad (micro-Siemens/cm)	200 – 600
Salinidad (ppt)	0.25 – 0.75
Amoníaco (mg/L)	< 0.02
Nitritos (mg/L)	< 0.1
Nitratos (mg/L)	< 50
Oxígeno (mg/L)	> 7

*Fuente: Tabla basada en (3Rs-Centre Utrecht Life Sciences, 2016; Aleström et al., 2020; Avdesh et al., 2012; Lee et al., 2022; Zebrafish Husbandry Association, 2021).*

Si el pH del agua llegara a acidificarse, se recomienda añadir bicarbonato de sodio para incrementarlo (Avdesh et al., 2012).

La temperatura del agua afecta directamente al pez cebra en la supervivencia de las larvas, su desarrollo, fenotipo y determinación del sexo, a temperaturas constantes de 24 a

29°C predomina el sexo masculino, y a temperaturas mayores predominan las hembras. Una temperatura de 28°C permitirá incrementar las tasas de crecimiento y supervivencia del pez. A una temperatura de 34°C los peces presentan menor ansiedad, pero un incremento en su agresividad (Lee et al., 2022).

El pez cebrá puede soportar un rango de temperatura de 15 a 36°C dependiendo del tipo de investigación a realizarse sin afectar su bienestar, siempre y cuando la temperatura se mantenga constante. Es importante recordar que la solubilidad del oxígeno disminuye conforme incrementa la temperatura del agua, por lo tanto, las fluctuaciones de temperatura deben controlarse de manera estricta (Aleström et al., 2020).

### ***C. Iluminación y ruido***

En condiciones naturales el fotoperiodo del pez cebrá es de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad, la proporción luz/oscuridad varía en los laboratorios. En un estudio se demostró que un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad en laboratorio mejoran la capacidad de crecimiento del pez cebrá (Abdollahpour et al., 2020).

***Tabla 4. Parámetros de iluminación para el pez cebrá en cautiverio***

<b>Parámetros</b>	<b>Valores</b>
Fotoperiodo (horas luz)	13 - 14
Fotoperiodo (horas oscuridad)	10 - 11
Tiempo de transición oscuridad-luz / luz oscuridad (minutos)	30
Luz fluorescente (lux)	54 - 334

*Fuente: Tabla basada en (Kohale, 2015; Meyers, 2018; Tsang et al., 2017).*

El pez cebra es fotoperiódico, por lo tanto, la luz afecta a su comportamiento, eclosión, crecimiento, desarrollo y desove. Las hembras desovan poco después de la salida del sol en condiciones naturales, por lo que se recomienda un cambio gradual de luz a oscuridad y viceversa para simular la madrugada y el atardecer. Se pueden utilizar luces fluorescentes dentro del laboratorio (Kohale, 2015; Tsang et al., 2017).

Los sistemas de alojamiento de peces cebra a gran escala utilizan equipos para el bombeo de agua y aire, filtración, alimentación y mantenimiento, produciendo un ruido por debajo de los 1000 Hz. Los individuos están expuestos a un ruido crónico dentro de su rango auditivo sensible. La información sobre la consecuencia del ruido en peces cebra en cautiverio es limitada, pero se conoce que algunos efectos del ruido de fondo son: una disminución en la viabilidad de los huevos, disminución de la tasa de crecimiento y desarrollo, y un incremento del estrés fisiológico (Lara & Vasconcelos, 2019).

**Tabla 5.** Rangos de detección de frecuencia y sensibilidad del pez cebra

<b>Audición del pez cebra</b>	<b>Valores (Hz)</b>
Rango de detección de frecuencia	100 - 8000
Rango auditivo sensible	600 - 1000

*Fuente: Tabla basada en (Lara & Vasconcelos, 2019).*

#### **D. Enriquecimiento ambiental**

No se dispone de información suficiente sobre enriquecimiento ambiental en el pez cebra. A pesar de esto, se recomienda enriquecer el alojamiento de los peces considerando la naturaleza de su especie. El pez cebra se encuentra en aguas poco profundas, caudales bajos con sustratos arenosos, limosos, de cal o de roca. Pasa más tiempo en entornos enriquecidos, amoblados con plantas o decoración de pecera, de esta manera se puede simular su hábitat

natural. El suministro de alimento vivo como enriquecimiento estimula el comportamiento de captura en las superficies (Aleström et al., 2020; Lara & Vasconcelos, 2019; Tsang et al., 2020).

**Tabla 6.** Opciones de enriquecimiento en base a preferencias del pez cebra

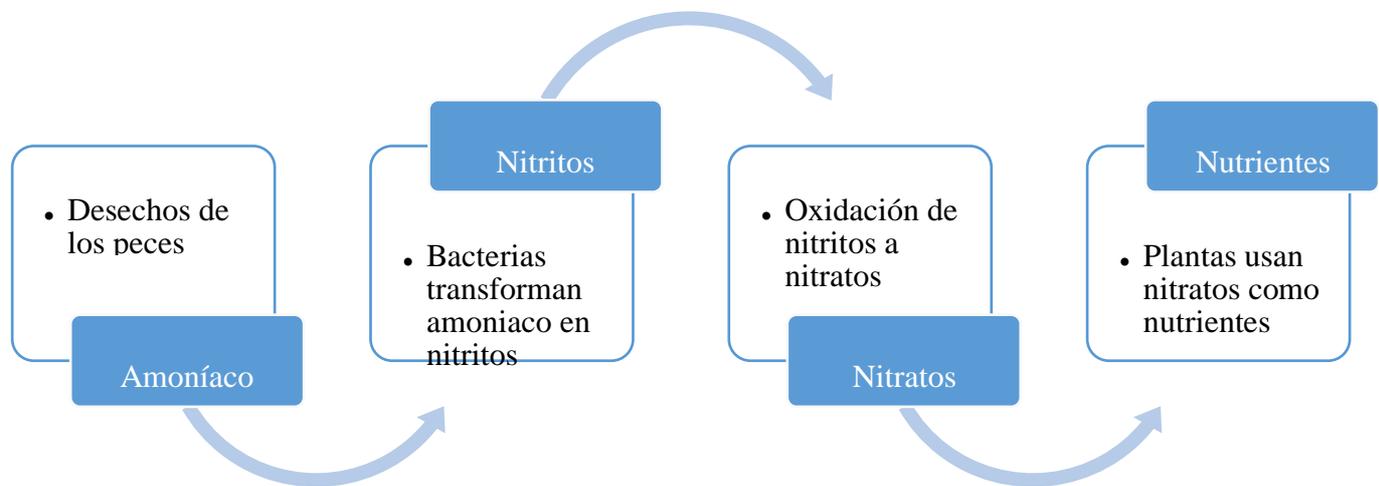
Tipo de enriquecimiento	Preferencias del pez cebra
Físico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sustratos: Grava</li> <li>• Plantas vivas: <i>Microsorium</i>, <i>Anubias</i>, plantas rizomatosas</li> </ul>
Nutricional	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alimento vivo: <i>Paramecium caudatum</i>, <i>Tetrahymena spp</i>, <i>Brachionus spp.</i> y <i>Artemia naupliin</i></li> </ul>
Social	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Paredes transparentes permiten la interacción de peces entre tanques reduciendo el estrés</li> </ul>
Sensorial	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fondos de color rojo</li> </ul>

Fuente: Tabla basada en (Aleström et al., 2020; Tsang et al., 2020).

Las plantas plásticas no tienen efectos importantes en peceras con varios animales, pero estas podrían utilizarse en alojamientos individuales. Se pueden presentar efectos toxicológicos por los aditivos del plástico como el bisfenol, o la liberación de micropartículas plásticas que podrían ser ingeridas por los peces o alojadas en los sistemas de agua de los tanques. Otra desventaja del uso de plásticos es el crecimiento bacteriano al no poder esterilizar estos materiales (Aleström et al., 2020).

Si se proporcionan plantas vivas o artificiales durante la cría, se producirán más huevos al simular orillas naturales, además, tanto los machos como las hembras prefieren entornos con flora a entornos vacíos. Un incremento en los niveles de amoníaco o nitritos provocará: enrojecimiento, hiperventilación, inflamación o protuberancia de las branquias, demasiado

tiempo en el fondo del tanque o en la superficie y una reducción de la inmunidad, aquí radica la importancia de la implementación de plantas vivas para la transformación de amoníaco en nutrientes (Tsang et al., 2020).



**Gráfico 1.** *Proceso de transformación de los desechos del pez cebra aprovechados por las plantas* (Tsang et al., 2020).

## Alimentación

Los peces cebra son omnívoros de agua dulce, se desconocen sus requerimientos nutricionales exactos, pero es necesario el aporte de proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas y minerales en dieta seca o viva en todos sus estadios de desarrollo. A los 5 días post fecundación las larvas pueden alimentarse de manera exógena gracias a la apertura de su boca y el desarrollo de su tracto digestivo (Zebrafish Husbandry Association, 2021).

La cantidad de alimento a suministrarse depende también del estadio de desarrollo de los peces y se calcula en base a un porcentaje de su peso corporal. Los animales que no sean destinados a programas reproductivos requieren un menor aporte nutricional (3Rs-Centre Utrecht Life Sciences, 2016).

**Tabla 7.** Requerimientos nutricionales de los peces cebra en su etapa juvenil y adulta

<b>Etapa de desarrollo</b>	<b>Proteínas (%)</b>	<b>Carbohidratos (%)</b>	<b>Lípidos (%)</b>
Juvenil	60	5	10
Adulto	55	5	15

Fuente: Tabla basada en (Zebrafish Husbandry Association, 2021).

**Tabla 8.** Tipo y tamaño del alimento acorde a las diferentes etapas de desarrollo del pez cebra

<b>Etapa de desarrollo</b>	<b>Tipo del alimento</b>	<b>Tamaño del alimento (um)</b>
Larvas 5 días en adelante	Vivo (recomendado) Seco	150 – 200
Juvenil	Vivo Seco	400 – 600
Adulto	Vivo Seco	400 – 600

Fuente: Tabla basada en (Zebrafish Husbandry Association, 2021).

**Tabla 9.** Frecuencia de alimentación y cantidad recomendada

<b>Etapa de desarrollo</b>	<b>Frecuencia de alimentación (veces al día)</b>	<b>Cantidad de alimento (% peso corporal)</b>
Larva	2 – 3	50 – 300
Adulto	2 – 3	3 – 5

Fuente: Tabla basada en (3Rs-Centre Utrecht Life Sciences, 2016; Aleström et al., 2020).

Una mezcla de alimentos vivos y procesados secos ha demostrado un incremento en el crecimiento y el rendimiento reproductivo; en teoría las dietas secas aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo del pez, mientras los alimentos vivos se consideran como una forma de enriquecimiento en la alimentación. En la actualidad se dispone de robots para suministrar alimento seco y vivo de forma automática. Usualmente se emplean organismos como: *Paramecium caudatum*, *Tetrahymena spp*, *Brachionus spp*. y *Artemia naupliin*

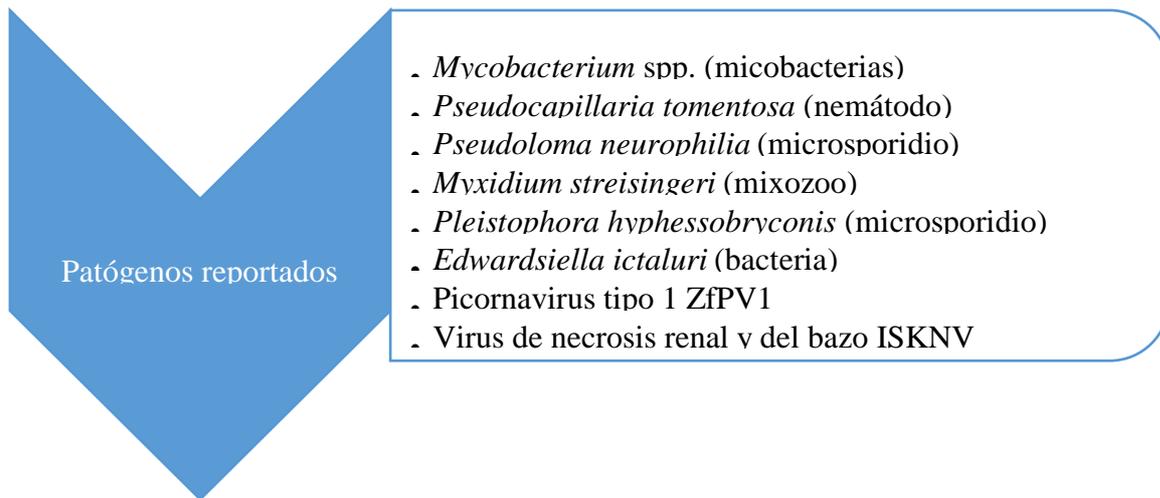
manteniendo siempre medidas de bioseguridad para evitar la contaminación con otros microorganismos (Aleström et al., 2020).

La mayor parte de laboratorios de investigación utilizan alimento seco específico para peces cebra o peces de acuario principalmente por su bajo costo, menor riesgo de contaminación y alta disponibilidad (Tsang et al., 2017).

### **Bioseguridad, sanidad e higiene**

La puesta en cuarentena de los nuevos individuos y el control de alimento vivo disminuye el riesgo de transmisión de patógenos, principalmente micobacterias que pueden provocar infecciones zoonóticas en el personal a cargo del bioterio. Se debe educar y entrenar al personal para detectar peces en mal estado, los peces que superen los 12 meses de edad son más propensos a contraer enfermedades y transmitirlos, por lo que deben trasladarse a cuarentena o sacrificarse. Para la detección de patologías pueden utilizarse pruebas de laboratorio como análisis histológicos o PCR. Quienes ingresen al bioterio o zona de cuarentena deben seguir protocolos para prevenir la diseminación de patógenos provenientes de los peces hacia el exterior y viceversa (Cartner et al., 2020; Murray et al., 2016).

El personal debe ajustar sus horarios de tal manera que no ingresen a la zona de cuarentena y área principal del bioterio el mismo día. Los equipos son exclusivos para cada área, estos no deben utilizarse en áreas diferentes, ya sea cuarentena o el área principal del bioterio (Murray et al., 2016).



**Gráfico 2.** Principales patógenos reportados en el pez cebra (Cartner et al., 2020; Murray et al., 2022).

MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zapatos de uso exclusivo para el área de bioterio (desinfectar periódicamente)</li> <li>• Zapatos de uso exclusivo para cuarentena (desinfectar periódicamente)</li> <li>• Uso de zapatones o cobertores de zapatos</li> <li>• Bata de laboratorio</li> <li>• Guantes de manejo</li> <li>• Desinfección con solución de lejía 600 ppm 2 veces por semana</li> <li>• Alfombras adhesivas en todas las entradas</li> <li>• Equipos exclusivos para cada área</li> <li>• Sustituir peces cada 6-12 meses</li> <li>• Destinar tanques para desove (desinfectar después de cada uso)</li> <li>• Remover individuos enfermos o afectados</li> <li>• Realizar monitoreos de rutina de los equipos de calidad del agua</li> <li>• Desinfectar superficies de embriones nuevos con hipoclorito de sodio a 30 ppm durante 10 minutos</li> </ul>

**Gráfico 3.** Medidas de bioseguridad a seguir por el personal del bioterio (Cartner et al., 2020; Murray et al., 2016).

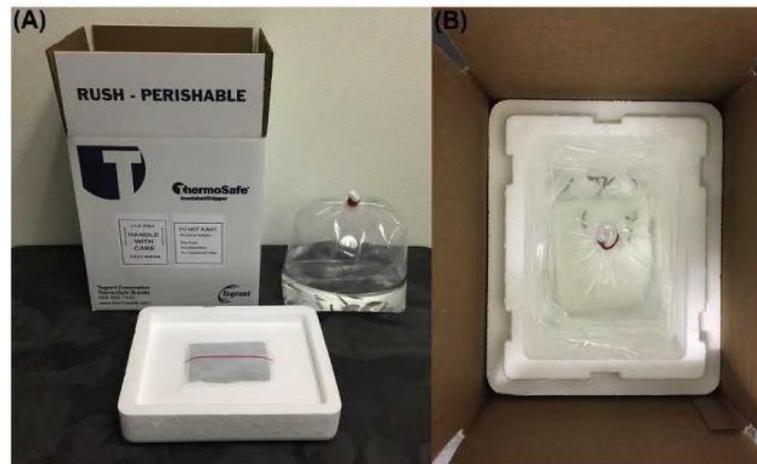
## Transporte animal

El movimiento de peces cebra de un laboratorio a otro implica planificar un envío seguro para los animales y dentro de un tiempo corto para garantizar el bienestar animal de la especie según las normativas vigentes nacionales e internacionales y evitar la diseminación de patógenos entre laboratorios. Se debe incluir la documentación de vigilancia sanitaria y los parámetros de cría de los peces si se encuentran disponibles. Al momento del envío es fundamental mantener los parámetros adecuados de calidad de agua, oxigenación, temperatura, niveles de CO<sub>2</sub> y nitrógeno (Aleström et al., 2020).

**Tabla 10.** Indicaciones para transportar diferentes estadios de desarrollo del pez cebra

A transportar	Indicaciones
Espermatozoides	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Utilizar tanques de nitrógeno líquido para mantener temperaturas ultrafrías y preservar células</li> </ul>
Embriones	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Realizar blanqueamiento o desinfección con hipoclorito de sodio o yodo antes del envío</li> <li>• Al llegar a su destino colocarlos en cajas Petri o tanques pequeños</li> </ul>
Adultos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• • Ayuno de 24 horas para evitar contaminación por desechos</li> <li>• Niveles de oxígeno de 1:1 en relación al agua</li> <li>• Mantener densidad de 2 peces por cada 0.5 litros de agua</li> </ul> <p>Contención primaria y secundaria en bolsas de polietileno de 3-4 mm de grosor con fondo cuadrado o de 1 sola costura</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Contenedor externo de poliestireno 2 pulgadas de grosor dentro de caja de cartón corrugado</li> </ul>

Fuente: Tabla basada en (Aleström et al., 2020; Cartner et al., 2020).



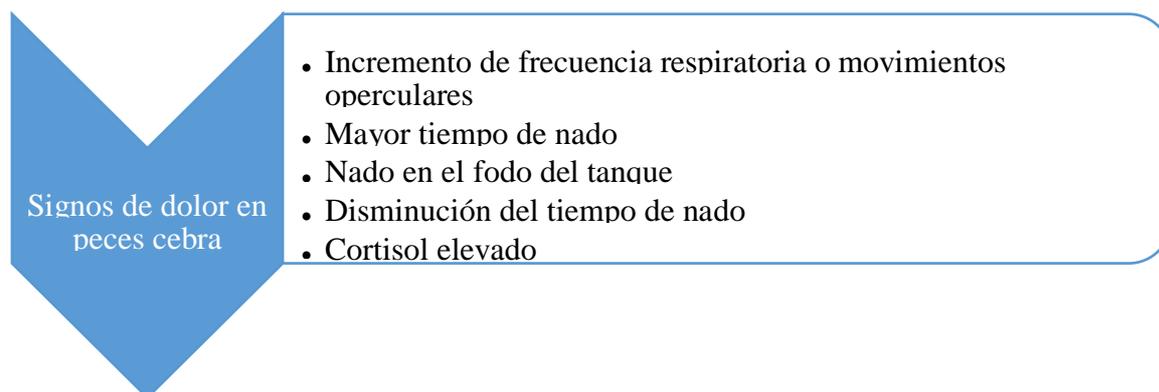
**Imagen 4.** (A): Vista externa de elementos de transporte para peces cebra adultos. (B): Vista interna de la caja de transporte (Cartner et al., 2020).

## MANEJO EXPERIMENTAL DEL PEZ CEBRA

### Reconocimiento del dolor y angustia

Si un procedimiento es doloroso para los humanos, es muy probable que lo sea para los animales. Los peces cebra no sienten dolor o angustia hasta los 7 días post fecundación, pasado este tiempo los peces sentirán dolor. Los factores que generan angustia son varios, es importante tomar en cuenta el comportamiento normal de esta especie para determinar la presencia de dolor o angustia (Cartner et al., 2020).

Al poseer sistema nociceptivo, los peces detectan lesiones en su organismo y expresan respuestas conductuales y fisiológicas ante estas lesiones. Esta especie presenta nervios aferentes y receptores opiáceos. Se cree que el pez cebra es consciente de su dolor como una experiencia desagradable. Difieren de los mamíferos ya que poseen una mayor cantidad de fibras A-delta que se encargan de mediar el dolor agudo o breve (3Rs-Centre Utrecht Life Sciences, 2016).



**Gráfico 4.** Principales signos de dolor en el pez cebra (Cartner et al., 2020).

### Anestesia y analgesia

Sigue siendo complicado mostrar estadios de dolor en el pez cebra, pero se conoce que los analgésicos son capaces de restaurar el comportamiento normal de los peces tras tratamientos potencialmente dolorosos e invasivos, incluyendo: antiinflamatorios no esteroideos o AINES, opioides y anestésicos. La importancia de la analgesia radica no solamente en el bienestar animal, sino también en los resultados de las investigaciones científicas pues evita el dolor remanente que podría interferir en dichos resultados (Ohnesorge et al., 2021).

**Tabla 11.** Analgésicos utilizados en peces cebra

Fármaco	Dosis para larvas (inmersión)	Dosis y vía para adultos
Morfina (opioide)	48 mg/L	5-8 mg/kg IP 2.5-5 mg/kg IM
Buprenorfina (opioide)	5 uM o 0.1 mg/L	-
Lidocaína (anestésico)	5 mg/L	1 mg/kg IM 2-5 mg/L inmersión 300 mg/L inmersión

Ácido acetil salicílico (AINE)	-	1-2.5 mg/L inmersión
Diclofenaco (AINE)	-	40 mg/kg IM
Indometacina (AINE)	-	5-20 uL IP

*Fuente: IP: intraperitoneal. IM: intramuscular. Inmersión: sumergir animales en solución. Basado en (Ohnesorge et al., 2021).*

Para la anestesia general, se recomienda sumergir a los peces en soluciones con anestésicos. El sistema nervioso central se ve afectado, produciendo a su vez una sedación o inconsciencia. El anestésico general más utilizado en peces cebra es el MS 222, mientras que el anestésico local más empleado es la lidocaína, que en inmersión induce analgesia (Ohnesorge et al., 2021).

**Tabla 12.** Dosis y usos de los anestésicos más utilizados en peces cebra

Fármaco	Dosis y uso
MS 222 (Metasulfonato de triclaína)	50 mg/L sedación 50-100 mg/L anestesia leve 100-200 mg/L anestesia quirúrgica
Benzocaína	25-100 mg/L anestesia leve
2-Fenoxietanol	200-300 uL/L anestesia leve
Eugenol, isoeugenol y aceite de clavo	2-5 mg/L sedación 60-100 mg/L anestesia quirúrgica
Clorhidrato de metomidato	2-4 mg/L sedación 6-10 mg/L anestesia leve
Lidocaína	300 mg/L anestesia leve 325 mg/L anestesia quirúrgica
Hipotermia	12°C sedación 10°C anestesia leve 0-4°C anestesia

*Fuente: Tabla basada en (Cartner et al., 2020).*

## Eutanasia

La eutanasia es una muerte humanitaria y digna. Se considera que un método de eutanasia es aceptable cuando se induce la muerte y pérdida de consciencia de manera rápida, sin dolor, ansiedad, estrés, angustia, de manera confiable e irreversible, además de requerir un corto periodo de tiempo para inducir la inconsciencia del animal (Cartner et al., 2020).

Ningún fármaco ha sido aprobado por la FDA para la eutanasia de animales acuáticos. Hace algunos años se recomendaba la inmersión de los peces en MS 222 o metasulfonato de tricafna, durante 10 minutos, pero se presentaron casos de recuperación de los peces post inmersión, por lo que ahora se recomienda un tiempo de inmersión de 30 minutos. El MS 222 provoca estrés en los peces adultos y no es eficaz en individuos menores a 14 días de edad, por lo que se recomienda emplear otro método de eutanasia (American Veterinary Medical Association, 2020).

El enfriamiento rápido o shock hipotérmico es el método de eutanasia que se prefiere en el pez cebra por presentar un 100% de efectividad, la temperatura disminuye a 2 o 4°C hasta que los animales pierden el sentido y el movimiento opercular termina. Este método detiene los signos vitales 20 veces más rápido que la inmersión en MS 222 (American Veterinary Medical Association, 2020; Strykowski & Schech, 2015).

**Tabla 13.** *Tiempo mínimo requerido para eutanasia por enfriamiento rápido posterior a la pérdida de movimiento ocular*

Estado de desarrollo	Tiempo (minutos)
Adultos	10
Alevines	20

Fuente: *Tabla basada en* (American Veterinary Medical Association, 2020).

**Tabla 14.** *Métodos de eutanasia, dosis e indicadores de muerte en peces cebra*

<b>Método</b>	<b>Descripción</b>	<b>Indicadores de muerte</b>
Inmersión	<p>Sobredosis mediante inmersión en soluciones</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Benzocaína <math>\geq</math> 250 mg/L</li> <li>• Dióxido de carbono</li> <li>• Etanol 10-30 mL 95%</li> <li>• Eugenol e isoeugenol 170 mg/L</li> <li>• Isoflurano y sevoflurano 5-20 mL/L</li> <li>• Sulfato de quinaldina <math>\geq</math> 100 mg/L</li> <li>• Metasulfonato de tricaína 250-500 mg/L</li> <li>• Lidocaína 400 mg/L</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pérdida de movimiento</li> <li>• No reacción a estímulos</li> <li>• Flacidez inicial seguida de rigidez cadavérica</li> <li>• Arresto respiratorio</li> </ul>
Inyección	<p>Vía intracelómica, intracardíaca, intravenosa e intramuscular</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pentobarbital sódico 60-100 mg/kg</li> <li>• Ketamina (posterior a esto se aplica pentobarbital) 66-88 mg/kg</li> <li>• Ketamina + medetomidina (posterior a esto se aplica pentobarbital) 1-2 mg/kg</li> <li>• ketamina + 0.05-0.1 mg/kg medetomidina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• (pérdida de movimientos operculares por al menos 30 minutos)</li> <li>• Pérdida de movimiento ocular</li> <li>• Ausencia de latido cardíaco</li> </ul>
Métodos físicos	<p>Realizados por personal entrenado y calificado</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Decapitación y descabezamiento</li> <li>• Transección cervical y descabezamiento</li> <li>• Traumatismo por objeto contundente</li> <li>• Maceración</li> <li>• Enfriamiento rápido (método más aceptado)</li> </ul>	<p>(la presencia de contracción cardíaca no es un indicador de vida pues el corazón de los peces continúa latiendo aún después de la muerte del animal)</p>

Fuente: *Tabla basada en (American Veterinary Medical Association, 2020).*

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 3Rs-Centre Utrecht Life Sciences. (2016). *Puntos finales humanitarios en la experimentación animal*. Conducta y Fisiología Normal: Pez Cebra.
- Abdollahpour, H., Falahatkar, B., & Lawrence, C. (2020). El efecto del fotoperiodo en el crecimiento y el rendimiento del desove del pez cebrá, *Danio rerio*. *Aquaculture Reports*, 17, 100295. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100295>
- Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario. (2021). Resolución XX. In *Resolución XX*. Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario.
- Aleström, P., D'Angelo, L., Midtlyng, P. J., Schorderet, D. F., Schulte-Merker, S., Sohm, F., & Warner, S. (2020). Pez cebrá: recomendaciones de alojamiento y cría. *Laboratory Animals*, 54(3), 213–224. <https://doi.org/10.1177/0023677219869037>
- American Veterinary Medical Association. (2020). *AVMA Directrices para la eutanasia de animales: 2020 Edition*. AVMA.
- Asamblea Nacional del Ecuador. (2014). Ley Orgánica de Bienestar Animal. In *Ley Orgánica de Bienestar Animal*.
- Avdesh, A., Chen, M., Martin-Iverson, M. T., Mondal, A., Ong, D., Rainey-Smith, S., Taddei, K., Lardelli, M., Groth, D. M., Verdile, G., & Martins, R. N. (2012). Cuidado y mantenimiento regular de un laboratorio de pez cebrá (*Danio rerio*): Una introducción. *Journal of Visualized Experiments*, 69. <https://doi.org/10.3791/4196>
- Benslimane, F. M., Zakaria, Z. Z., Shurbaji, S., Abdelrasool, M. K. A., Al-Badr, M. A. H. I., al Absi, E. S. K., & Yalcin, H. C. (2020). Evaluación de la función cardíaca y de la hemodinámica del flujo sanguíneo en el pez cebrá (*Danio rerio*) mediante videomicroscopía de alta velocidad. *Micron*, 136, 102876. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2020.102876>
- Cartner, S., Eisen, J., Farmer, S., Guillemín, K., Kent, M., & Sanders, G. (2020). El pez cebrá en la investigación biomédica, biología, cría, enfermedades y aplicaciones de investigación. En *Risk-based Energy Management*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817491-3.00014-3>
- Chang, Z., Chen, P.-Y., Chuang, Y.-J., & Akhtar, R. (2018). El pez cebrá como modelo para estudiar la maduración ósea: Caracterización estructural y mecánica a nanoescala de los cambios relacionados con la edad en la columna vertebral del pez cebrá. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 84, 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.05.004>
- Dabrowski, K., & Miller, M. (2018). Paradigma controvertido en la cría del pez cebrá (*Danio rerio*). *Zebrafish*, 15(3), 295–309. <https://doi.org/10.1089/zeb.2017.1515>
- Delomas, T. A., & Dabrowski, K. (2019). Protocolo mejorado para el crecimiento rápido del pez cebrá sin reducir el rendimiento reproductivo. *Aquaculture Research*, 50(2), 457–463. <https://doi.org/10.1111/are.13912>
- Harper, C., & Lawrence, C. (2011). *El pez cebrá de laboratorio*. Taylor and Francis Group.

- Kohale, K. (2015). Cría de pez cebra en un entorno de laboratorio en el TIFR. *Journal of Laboratory Animal Science*, 3(1).
- Lara, R. A., & Vasconcelos, R. O. (2019). Caracterización del paisaje sonoro natural del pez cebra y comparación con las condiciones de ruido en cautividad. *Zebrafish*, 16(2), 152–164. <https://doi.org/10.1089/zeb.2018.1654>
- Lee, C. J., Paull, G. C., & Tyler, C. R. (2022). Mejorar el bienestar del pez cebra en el laboratorio y la investigación científica mediante la comprensión de su historia natural. *Biological Reviews*. <https://doi.org/10.1111/brv.12831>
- Liu, Y., Li, D., & Yuan, Z. (2016). Imágenes de tomografía fotoacústica del pez cebra adulto mediante el uso de transductores de ultrasonido de alta frecuencia desenfocados y enfocados. *Applied Sciences*, 6(12), 392. <https://doi.org/10.3390/app6120392>
- Meyers, J. R. (2018). Pez cebra: Desarrollo de un organismo modelo vertebrado. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 16(1), e19. <https://doi.org/10.1002/cpet.19>
- Murray, K. N., Clark, T. S., Kebus, M. J., & Kent, M. L. (2022). Libre de patógenos específicos - Una revisión de las estrategias en la agricultura, la acuicultura y los mamíferos de laboratorio y cómo informan las nuevas recomendaciones para el pez cebra de laboratorio. *Research in Veterinary Science*, 142, 78–93. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.11.005>
- Murray, K. N., Varga, Z. M., & Kent, M. L. (2016). Bioseguridad y control sanitario en el Centro Internacional de Recursos del Pez Cebra. *Zebrafish*, 13(S1), S-30-S-38. <https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1206>
- Ohnesorge, N., Heintl, C., & Lewejohann, L. (2021). Métodos actuales para investigar la nocicepción y el dolor en el pez cebra. *Frontiers in Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.632634>
- Presslauer, C., Tilahun Bizuayehu, T., Kopp, M., Fernandes, J. M. O., & Babiak, I. (2017). Dinámica del transcriptoma del miRNA durante el desarrollo gonadal del pez cebra. *Scientific Reports*, 7(1), 43850. <https://doi.org/10.1038/srep43850>
- Rasmussen, J. P., Vo, N.-T., & Sagasti, A. (2018). Las escamas de los peces dictan el patrón de inervación y vascularización de la piel adulta. *Developmental Cell*, 46(3), 344-359.e4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.06.019>
- Reed, B., & Jennings, M. (2011). *Guía para el alojamiento y cuidado del pez cebra Danio rerio*. RSPCA .
- Ribas, L., & Piferrer, F. (2014). El pez cebra (*Danio rerio*) como organismo modelo, con énfasis en las aplicaciones para la investigación de la acuicultura de peces de aleta. *Reviews in Aquaculture*, 6(4), 209–240. <https://doi.org/10.1111/raq.12041>
- Roxo-Rosa, M., Lopes, S., Tavares Carvalho, J. C., Solis Murgas, L. D., Jakhmola-Mani, R., Pande Katare, D., Mittal, K., & Bozkurt, Y. (2020). El pez cebra en la investigación biomédica (Y. Bozkurt, Ed.). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.82977>
- Shamsi, S., Alagan, A. A., Sarchio, S. N. E., & Md Yasin, F. (2020). Síntesis, caracterización y evaluación de la toxicidad del óxido de grafeno funcionalizado con plurónico F127 en

- el desarrollo embrionario del pez cebra (*Danio rerio*). *International Journal of Nanomedicine*, *Volume 15*, 8311–8329. <https://doi.org/10.2147/IJN.S271159>
- Singleman, C., & Holtzman, N. G. (2014). Crecimiento y maduración del pez cebra, *Danio Rerio*: Una herramienta de puesta en escena para la enseñanza y la investigación. *Zebrafish*, *11*(4), 396–406. <https://doi.org/10.1089/zeb.2014.0976>
- Spence, R., & Smith, C. (2008). Preferencia de color innata y aprendida en el pez cebra, *Danio rerio*. *Ethology*, *114*(6), 582–588. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2008.01515.x>
- Stevens, C. H., Reed, B. T., & Hawkins, P. (2021). Enriquecimiento para el pez cebra de laboratorio: una revisión de las pruebas y los desafíos. In *Animals* (Vol. 11, Issue 3, pp. 1–22). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ani11030698>
- Strykowski, J. L., & Schech, J. M. (2015). Eficacia de los métodos de eutanasia recomendados en las larvas de pez cebra (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, *54*(1), 81–84. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25651096>
- Teame, T., Zhang, Z., Ran, C., Zhang, H., Yang, Y., Ding, Q., Xie, M., Gao, C., Ye, Y., Duan, M., & Zhou, Z. (2019). El uso del pez cebra (*Danio rerio*) como modelo biomédico. *Animal Frontiers*, *9*(3), 68–77. <https://doi.org/10.1093/af/vfz020>
- Tsang, B., Ansari, R., & Gerlai, R. T. (2020). Mantenimiento y cría del pez cebra, teniendo en cuenta algunas consideraciones etológicas y ecológicas. En *Behavioral and Neural Genetics of Zebrafish* (pp. 17–32). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817528-6.00002-4>
- Tsang, B., Zahid, H., Ansari, R., Lee, R. C.-Y., Partap, A., & Gerlai, R. (2017). La cría del pez cebra: Una revisión de los diferentes métodos y una discusión sobre la estandarización. *Zebrafish*, *14*(6), 561–573. <https://doi.org/10.1089/zeb.2017.1477>
- Wang, Z., Zhao, H., Xu, Y., Zhao, J., Song, Z., Bi, Y., Li, Y., Lan, X., Pan, C., Foulkes, N. S., & Zhang, S. (2022). La exposición al plomo en las primeras etapas de la vida induce una toxicidad a largo plazo en el sistema nervioso central: De las larvas de pez cebra a los juveniles y adultos. *Science of The Total Environment*, *804*, 150185. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150185>
- Zebrafish Husbandry Association. (2021). *Zebrafish Husbandry Association*. Conceptos básicos del pez cebra.