

CAPÍTULO 19

Peces como animales de experimentación

Juan Martín Laborde

Introducción

La utilización de los peces como animales de experimentación se conoce desde hace mucho tiempo, y se evidencia un incremento notable en los últimos años debido al desarrollo y aplicación de modelos transgénicos que los posicionan en alternativas de elección de vertebrados para realizar estudios en reemplazo de especies tradicionales. En la actualidad el uso de los peces está orientado a las investigaciones biomédicas y ambientales y por lo tanto es importante elaborar directrices que sean útiles para el investigador principal y el personal responsable del cuidado, cría y manejo de los peces, como también de ayuda a los miembros de los Comités Institucionales de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUALes) cuando se evalúen protocolos en los que se usen estas especies.

Durante los últimos 10 años, el uso de peces en la investigación ha ido en aumento debido a la amplia gama de posibilidades para utilizarse como modelos animales por sus propiedades biológicas particulares. También ha aumentado la concientización sobre la salud de los mismos como un factor que afecta al medio ambiente y como agentes indicadores de contaminación ambiental, de manera que la investigación sobre los peces y, más específicamente, la investigación en acuicultura permite abordar cuestiones relacionadas con la contaminación ambiental, la conservación y la protección del medio marino y de estuarios de agua dulce (Canadian Council on Animal Care, 2005; Håstein y col., 2005; Spence y col., 2008).

Origen del pez como animal de laboratorio

Los orígenes de la utilización de peces como animales de laboratorio datan del año 1970 cuando los mismos comenzaron a ser utilizados como indicadores de contaminación acuática en diversos países de Europa. Posteriormente el pez cebra fue la especie elegida para realizar el 80% de las investigaciones con esta especie. La investigación con peces en la ciencia de animales de laboratorio explora y utiliza su increíble diversidad dentro de las 20.000 especies existentes en todo el mundo las que constituyen alrededor de la mitad de todas las especies

vivas de vertebrados, lo que los convierte en el mayor grupo de vertebrados vivos del planeta (Håstein y col., 2005; Spence y col., 2008).

Biología, taxonomía y características anatómicas

Los peces son animales de sangre fría (ectotermos = poiquilotermos), caracterizados por poseer vértebras, branquias y aletas. Dependen fundamentalmente del agua, que es el medio donde viven. Su origen se remonta al período Devónico, hace 300 millones de años.

Los peces se clasifican en tres grandes grupos: Placodermos: son peces acorazados, especies arcaicas ya extinguidas. Condroictios: peces cartilagosos como es el caso de rayas, tiburones, etc. Se caracterizan por tener esqueleto cartilaginoso, piel recubierta por escamas placoides (con una placa en la base y una espina saliente), poseer de cinco a siete pares de branquias separadas por laminillas branquiales (por eso también se los denomina elasmobranchios; elasmo = laminilla), aleta caudal con un lóbulo mayor que el otro y la boca provista de varias series de dientes, muy duros y puntiagudos, que son reemplazados por los anteriores cuando estos se caen por el uso. Osteictios: Peces óseos (teleosteos), son los más numerosos y complejos, y donde ya se han clasificado más de 20.000 especies. La mayoría de ellos se encuentran actualmente poblando las aguas continentales y marítimas. Entre las características sobresalientes de los peces óseos se destacan las siguientes:

- Son vertebrados acuáticos de esqueleto óseo.
- Respiran por medio de branquias
- Tienen la piel recubierta por escamas.
- Presentan un sistema circulatorio simple.
- Poseen aletas de diversas estructuras y formas.
- Su reproducción es generalmente externa.
- Son animales poiquilotermos.
- Tienen vejiga natatoria.

La anatomía de los peces se encuentra condicionada por dos grandes factores que inciden sobre su existencia, por una parte el medio acuático, y por otra la condición de animales poiquilotermos (Canadian Council on Animal Care, 2005; Håstein, 2005).

El bienestar animal

Para realizar cualquier investigación con peces como modelo animal se recomienda que se provea un ambiente apropiado y asesoramiento de expertos sobre el ambiente y comportamiento de las diferentes especies. Los principios sobre bienestar animal no incluyen a los peces ni a ninguno de los vertebrados de sangre fría, pero se pueden tener en cuenta varios de

sus preceptos como seleccionar especies animales que sean apropiadas para la investigación, condición sanitaria requerida, así como usar el número mínimo de animales suficientes para obtener resultados válidos y confiables. También deben considerarse alternativas no animales a fin de evitar malestar, angustia o dolor y estar en concordancia con los principios propuestos en las tres “Rs” de Russel y Burch.

Las condiciones de cautiverio deben contribuir con la salud y el bienestar del animal. Los peces deben ser atendidos por personal capacitado y experimentado, incluido el cuidado veterinario, como también los investigadores ser estrictamente calificados y acreditar experiencia y formación suficiente antes de iniciar investigaciones con animales (Canadian Council on Animal Care, 2005; Håstein y col., 2005; Spence y col., 2008).

Procedimientos de desarrollo para la producción de peces

Macroambiente y microambiente

Instalaciones

Existen más de 20.000 especies de peces que viven bajo condiciones ambientales diferentes, por lo tanto, la cría variará dependiendo del ambiente natural para cada especie en particular. Los sistemas de alojamiento deben ser preparados y aclimatados antes de recibir animales. Durante la construcción, es necesario proporcionar el espacio adecuado y considerar la calidad del agua. Si se utiliza un suministro de agua de red urbana, esta debe ser libre de cloro, lo cual se logra mediante la aireación de la misma o por filtración a través de carbón activado o compuestos que precipitan el cloro, tales como tiosulfato de sodio. Toda el agua debe analizarse antes de su uso y tiene que poseer los niveles apropiados de pH, amoníaco, nitrato y calcio en el medio acuoso. Los sistemas de producción de peces de laboratorio incluyen acuarios estáticos o con circulación cerrada de agua; también en estanques o lagos con una red o jaula colocada en el cuerpo de agua en los que puede existir una circulación abierta de provisión de la misma. Los dos primeros métodos se utilizan comúnmente en los laboratorios de investigación de peces y tienen muchas ventajas sanitarias por lo que se recomiendan, aunque los equipamientos de estanques pequeños separados y recirculación de agua son muy costosos y es necesaria una inversión inicial importante para equipar un laboratorio o centro de cría.

Construcción

Una planificación cuidadosa es crucial en la elección de materiales (vidrio, concreto, plástico o fibra) para la construcción de tanques, cubiertas de tanques (para evitar la pérdida de peces y contaminación) y conexiones. Los materiales del tanque es recomendable que sean razonablemente inertes al agua. En laboratorios se utilizan estanques de plástico que pueden retirarse y ser autoclavados una vez finalizada la experiencia. Los materiales de construcción no tienen que contener cobre, níquel, cadmio o estaño. Los tubos de cloru-

ro de polivinilo se usan comúnmente, pero una vez instalado, el sistema debe ser adecuadamente enjuagado para eliminar la acetona, metiletilcetonas y tetrahidrofuranos residuales que se liberan después del encolado.

Calidad del agua

La filtración biológica, mecánica, química (adsorción) y la desinfección son los cuatro procesos principales a implementar para mantener sistemas de agua cerrados. El cloro debe eliminarse por filtrado o agitación del agua y no tiene que superar 0,003 mg / L. La filtración biológica implica a bacterias heterotróficas y autotróficas (*Nitrobacter* y *Nitrosomonas*) que convierten los compuestos orgánicos nitrogenados (excretas de peces, que consisten principalmente en amoníaco) en nitritos y luego en nitratos que son menos tóxicos. La filtración química que incluye carbón activado granular y resina granulada como intercambiadores de iones se utiliza para reducir el carbono orgánico, amoníaco, nitratos y fosfatos. Los métodos de desinfección por ozonización (O₃) y el tratamiento con luz ultravioleta (UV) se han utilizado para oxidar la materia orgánica y matar las bacterias en los sistemas de flujo y recirculación de agua.

Temperatura

El metabolismo, la salud, los requerimientos de nutrientes, el rendimiento, la reproducción y, en casos extremos, la supervivencia de los peces depende de la temperatura del agua. El equilibrio gradual de la temperatura del agua es crucial en la transferencia, transporte, cría y aclimatación de los peces, así como cuando se ajusta la temperatura del agua.

Iluminación

Tanto el fotoperíodo (horas de luz/oscuridad) como la intensidad de la luz son importantes y los requisitos varían entre las especies. Aunque la mayoría de las especies se desarrollan bien con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, 8-10 horas de luz son generalmente adecuadas para la mayoría de los peces, mientras que 12-14 horas son más apropiadas para las especies de peces tropicales. El pasaje de luz a oscuridad y viceversa en forma gradual puede ser configurado con un temporizador que enciende y apaga la luz durante 30 minutos antes y después de las luces del tanque principal. En relación a la calidad de la luz, la iluminación fluorescente se utiliza comúnmente en acuarios. Generalmente, se puede usar una intensidad de 10-12.000 lux de iluminación de espectro completo sobre la superficie del agua y una longitud de onda de entre 475 y 650 nm a la intensidad adecuada proporcionará una iluminación de buena calidad.

Dieta

Las dietas deben estar formuladas teniendo en cuenta los requisitos de energía y la inclusión de todos los nutrientes esenciales. La preparación tiene que realizarse apropiadamente para satisfacer las necesidades específicas de cada investigación y cada especie,

para asegurar la supervivencia de los animales en el medio acuático y minimizar la contaminación del agua.

pH

Son deseables niveles de pH entre 6,5 y 9,0. El pH tiene múltiples efectos sobre los niveles de gases disueltos y la disolución de metales en el agua, así como sobre la absorción de oxígeno por los peces. También afecta a ácidos orgánicos y fosfatos y la proporción de amoníaco no ionizado y ionizado. Los peces varían en su tolerancia al pH en diferentes etapas de su vida. Se requieren niveles de 6,5 o más para la cría y reproducción normales. También hay variación de las diferentes especies en el requisito de pH. Hay que considerar que los niveles de amoníaco, CO₂ y ácidos orgánicos son importantes para el mantenimiento adecuado del pH.

Salinidad, Alcalinidad y Dureza

La cantidad total de materiales sólidos disueltos en el agua es importante. Los peces necesitan elementos específicos para llevar a cabo procesos bioquímicos vitales y dependen de su medio de existencia para el mismo.

La cantidad de sales disueltas en el agua afecta la densidad de la misma y los requerimientos de temperatura de algunas especies. Al transferir peces de un hábitat a otro, cualquier cambio en la salinidad debe ser gradual.

La alcalinidad del agua es una medida de la capacidad de neutralización del ácido. Los bicarbonatos, carbonatos, boratos, fosfatos y otros aniones contribuyen a la alcalinidad que se expresa en miliequivalentes por litro (mEq / L). La alcalinidad adecuada (0,2-10 mEq / l, agua de mar 2,5 mEq / L) garantiza el almacenamiento en buffer de los metales ácidos y el correcto funcionamiento de los biofiltros.

La dureza es la medida del contenido mineral (principalmente calcio, magnesio y otros cationes divalentes). El agua puede ser muy dura a muy blanda dependiendo de los niveles de los minerales disueltos (Moe, 1992). Una dureza apropiada del agua puede disminuir el estrés, la toxicidad de los metales disueltos y el amoníaco.

Para mantener los peces sanos, el oxígeno disuelto (OD) debe estar cerca de la saturación a cualquier temperatura y salinidad. El oxígeno se difunde en el agua por varios medios de aireación: agitación, oxígeno líquido, difusores de aire (usando compresores de aire o aireadores), tubos en U, piedras porosas y tubos elevadores de burbujas de aire. Una disminución de OD representa un signo de estrés en los peces. La cantidad de oxígeno que un pez requiere depende de la etapa de la vida en la que se encuentre, de la especie, tamaño, así como de la temperatura del agua. Un caudal de 0,7 L de agua por minuto asegura la saturación. Se ha establecido el valor de 5 mg / L como concentración mínima de OD para una salud óptima de los peces.

El nitrógeno está presente en el agua como gas, nitritos, nitratos y amoníaco. El amoníaco es el nitrógeno inorgánico más tóxico producido por los peces y por las bacterias heterotróficas de los filtros biológicos. Se considera que 0,02 mg / L de amoníaco no ionizado es seguro. El

nitrito se forma en procesos de nitrificación y desnitrificación y causa meta hemoglobinemia y, en última instancia, hipoxia. El exceso de amoníaco y los niveles de nitrito son los principales responsables del "síndrome del tanque nuevo" en los peces.

Selección de especies

Al elegir los peces para la investigación de laboratorio, la primera consideración debe ser la elección de las especies a utilizar. Dependiendo del tipo de investigación, las especies se dividen en dos tipos principales: marinos y de agua dulce o salobre. Tomar esta decisión determinará gran parte de la estructura de apoyo vital necesaria, así como comenzar a establecer las medidas de cría. La facilidad de mantenimiento es también un componente principal de la elección de especies. Los animales delicados que requieren cuidados especiales varias veces al día y los que sufren mayores tasas de mortalidad pueden no ser tan deseables como los peces más resistentes que requieren menos tiempo por parte del personal del laboratorio. Factores como la dieta, los requisitos de temperatura, la resistencia a las enfermedades y la compatibilidad social todos deben considerarse antes de seleccionar una especie. Los requisitos de espacio, también, tienen que definirse. Algunas especies, ya sea por su tamaño o por su naturaleza activa o agresiva, necesitan ambientes más grandes, que pueden ocupar espacio en el laboratorio y requerir equipos de alojamiento más grandes y costosos.

Obtención de peces

Una vez que se ha seleccionado una especie de pez adecuada, el investigador debe elegir entre adquirir animales criados en cautiverio o capturados en forma silvestre. Los peces criados en cautiverio son suministrados principalmente por viveros y casas de abastecimiento para laboratorios, también algunos acuarios y aficionados son capaces de proveerlos.

Transporte

Después de la adquisición de los animales de su ambiente natural o de un criadero, se debe tener en cuenta la calidad del agua durante el transporte. En general, cuando se transportan los peces, el enfriamiento del agua tiende a disminuir la tasa metabólica del animal y, por tanto, disminuye la cantidad de amoníaco excretado en el agua. Además, las temperaturas más bajas reducen la necesidad de oxígeno. Los especímenes no deben alimentarse durante 2-3 días previos al transporte, por lo que disminuye la actividad del tracto digestivo y se evita la contaminación del agua de transporte ya que las excretas de los animales disminuyen el pH y afec-

tan la salud de los mismos. Dependiendo de la especie y la duración del tiempo en tránsito, este período de ayuno por lo general es de 1 y 5 días, siendo dos días lo habitual. Deberá utilizarse el número adecuado de cajas de poliestireno y bolsas de polietileno, según el tamaño, la compatibilidad de los peces y la duración en tiempo de su traslado. Con todas las especies, la mejor manera de enviar peces es en una bolsa de plástico llena de agua y oxígeno y envasada en un recipiente aislado de espuma de poliestireno (telgopor) utilizado como caja de transporte, se deben usar bolsas de fondo cuadrado ya que los peces pueden quedar atrapados en las costuras de las bolsas convencionales disponibles en el mercado. Es necesario llenar la bolsa de transporte hasta la mitad con el agua original de residencia permanente de los peces e inflar el resto de la bolsa con oxígeno o aire comprimido para luego amarrarla con una banda de goma para que no se escape el gas o el agua. Cuando las bolsas estén preparadas, pueden envasarse de forma plana en la caja de transporte de peces y colocarlas a su vez dentro de una caja de cartón más grande que luego debe sellarse. En la caja de transporte se recomienda colocar un bloque de hielo mientras se envían especies de agua fría. Un buen trabajo de embalaje conservador debe lograr mantener a los peces de 12 a 24 horas. Dichos contenedores pueden enviarse por transporte aéreo y deben estar debidamente etiquetados. Las cajas de transporte de uso múltiple, muy utilizadas en la actualidad, son buenas para los transportes que tardan de 48 a 72 horas. Si es posible, es aconsejable limitar el tiempo del viaje a menos de 24 horas. Ocasionalmente los peces pueden tranquilizarse ligeramente con un anestésico como MS-222 previo a su traslado.

Producción

Los protocolos de producción de peces varían significativamente entre las especies. Las especies pequeñas extensamente criadas en el laboratorio incluyen el medaka japonés, el pez guppy, y el pez cebra. Los métodos para producir peces transgénicos para investigaciones continúan desarrollándose. Las directrices para la cría de peces en estanques se pueden obtener a partir de los procedimientos actuales de acuicultura. Cuando se desean mantener estanques de investigación, hay que considerar varios factores incluyendo los requerimientos de especies, disponibilidad de sustrato, fuente u origen del suministro de agua (arroyos de agua dulce, agua de pozo, salobre o agua salada) y drenaje. La descarga, especialmente para protocolos de investigación, debe estar de acuerdo con las regulaciones estatales y locales.

Manejo y sujeción de peces

En la manipulación de peces hay que tener en cuenta que son capaces de experimentar dolor, angustia, estrés y baja adaptación a los cambios bruscos de temperatura por el hecho de ser ectotermos acuáticos. Las branquias son estructuras muy delicadas que colapsan cuando

los animales se retiran del agua impidiendo su función respiratoria además poseen escamas cubiertas por una piel formada por células vivas protegidas por una capa mucosa conformando un sistema de protección externo que es muy frágil por lo cual, durante el manejo de los animales, puede dañarse permitiendo el ingreso de patógenos. Por lo tanto, el personal a cargo del cuidado de los animales debe estar debidamente entrenado para satisfacer los requerimientos de las especies que se producen en el laboratorio. También es importante la implementación de barreras de bioseguridad a fin de mantener las condiciones sanitarias de los animales y evitar el contagio de enfermedades zoonóticas. Los peces pueden capturarse con una red de malla fina y suave para evitar el deterioro de su capa externa. De ser necesario sujetar el pez para realizar inoculaciones, se debe hacer con guantes y en el menor tiempo posible. En peces de mayor tamaño y una vez capturados con una red, pueden sujetarse tomándolos con la mano en forma firme del pedúnculo caudal.

Usos en investigación

Los peces son un modelo animal ideal para realizar investigaciones en el campo de la biomedicina debido a su pequeño tamaño, la alta tasa reproductiva, un sistema nervioso central desarrollado y el parentesco con vertebrados endotérmicos. El criterio de selección de peces que se utilizan en investigación se basa en la disponibilidad, la supervivencia en acuarios y la información disponible. Una gran variedad de especies se utiliza en estudios de regulación de la temperatura y electrolitos, embriología, endocrinología, inmunología, fisiología, enfermedades bacterianas, comportamiento, genética y toxicología en la polución del agua.

Además de las investigaciones en laboratorio es posible realizar experiencias sobre los peces en su ambiente natural, donde los mismos también están sometidos a tensiones ambientales (causadas por el hombre y por agentes naturales) que pueden perjudicar su salud y bienestar. Recientemente, como resultado de una mayor preocupación por el uso humano de los vertebrados superiores en la investigación, los peces han sido evaluados como un reemplazo en estudios toxicológicos, farmacológicos y genéticos en vez de emplear ratones, ratas u otras especies de mamíferos. Todo esto produjo un incremento en el uso del pez en las investigaciones y amplió la base de los conocimientos sobre el cuidado y uso de estas especies en el laboratorio. Actualmente, la Ley de Bienestar Animal no incluye ciertos animales como los vertebrados de sangre fría. Sin embargo, todas las instituciones financiadas por entidades de salud pública deben seguir la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, que abarca todas las especies de vertebrados incluidas las especies de sangre fría, entre estas a los peces, considerando una manera profesional y humanamente apropiada para el manejo y uso de la especie en cuestión (Canada Council on Animal Care, 2005; Håstein y col., 2005; Spence y col., 2008).

Especies marinas y de agua dulce que se utilizan en experimentación

Algunas especies de peces que se utilizan con frecuencia en investigaciones son la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (que oscila entre 25 y 30 cm de longitud) y otros salmónidos, como el salmón coho (*O. kisutch*), el salmón rojo (*O. nerka*) Salmón atlántico (*Salmo salar*) y trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*) (menos de 25 cm de largo). Las pruebas de toxicidad se realizan frecuentemente con peces pequeños (*Pimphale promelas*) (hasta 10 cm), carpa blanca (*Cyprinodon variegatus*) (8 cm), platijas (*Menidia beryllina* y *M. menidia*) (hasta 14 cm) y el medaka japonés (*Oryzias latipes*) (hasta 4 cm). Otras especies frecuentemente estudiadas son el siluro de canal (*Ictalurus punctatus*) (hasta 1,2 m), las cabezas moteadas (*Ictalurus nebulosus*) (hasta 50 cm), el pez luna (*Lepomis macrochirus*) (aproximadamente 20 cm), la tilapia (*Oreochromis mossambicus*) (hasta 40 cm), Amazon molly (*Poecilia formosa*) (3-5 cm) y anguila americana (*Anguilla rostrata*) (hasta 1,2 m). También se utilizan especies ornamentales como el pez dorado (*Carassius auratus*) (hasta 30 cm) y koi (*Cyprinus carpio*) (hasta 60 cm).

El pez cebra (*Danio rerio*) es una de las especies más utilizada como animal de experimentación. Este modelo animal tiene menos de 5 cm de largo, se está utilizando actualmente en estudios moleculares y genéticos, en biología del desarrollo, oncología, toxicología, reproducción, genética, neurobiología, ciencias ambientales, en los estudios sobre células madre en la medicina regenerativa y en trabajos sobre la teoría de la evolución.

El pez cebra se llama así por las líneas laterales que adornan su cuerpo y se ha convertido en uno de los animales de laboratorio preferidos por los investigadores. Genéticamente, este pez tropical de agua dulce, posee el 80% del genoma idéntico a los humanos e incluye unos 17.000 genes (el humano tiene 20.000) condición que permite que los resultados que se obtengan en estos animales sean potencialmente extrapolables al ser humano. Posee una filogenia más cercana a la especie humana que la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*) o el gusano nematode (*Caenorhabditis elegans*) y es más fácil de manipular, mantener y criar que la rata (*Ratus ratus* y *R. norvergicus*) o el ratón (*Mus musculus*), siendo estas las especies más utilizadas en experimentación animal. El pez cebra es un organismo modelo, práctico y de elección para estudios dedicados al desarrollo de vertebrados y función génica. Entre sus ventajas posee un rápido desarrollo, externo y es transparente desde el estado de huevo a la larva en 3 días; características que facilitan la manipulación experimental en trasplante celular y observación con diferentes técnicas de microscopía. Sus órganos se forman en sólo 24 horas, gracias a lo cual se pueden realizar diferentes experimentos en una misma generación de animales, investigar la evolución de patologías e identificar las causas de enfermedades. Otra de las ventajas es su capacidad reproductiva ya que la hembra produce hasta 200 huevos lo que permite contar con un número importante de ejemplares para los ensayos en poco tiempo. A pesar de la distancia evolutiva entre esta especie y el humano, el desarrollo de los órganos es similar, como ocurre a nivel del sistema nervioso, páncreas, timo o vasos sanguíneos. Los órganos del pez cebra llevan a cabo las mismas funciones básicas que los órganos humanos, y están sujetos a desórdenes y enfermedades similares.

El pez cebra tiene la capacidad de regeneración en varios órganos como aletas, piel, corazón, cerebro y pueden regenerar fotorreceptores y neuronas de la retina tras una lesión. Este desarrollo en investigación está permitiendo a la comunidad científica entender los mecanismos de cicatrización y regeneración en otros vertebrados. Actualmente se ha descubierto que esta especie posee otra característica: es capaz de regenerar lesiones cerebrales, condición que en otros vertebrados como por ejemplo el humano no sucede. En estudios realizados recientemente se han identificado las células responsables de esta capacidad regenerativa que son un tipo de células madre que pertenecen a lo que se conoce como glía radial. Al detectar el daño, estas células, se dividen, viajan hasta la zona de la lesión y allí se transforman en neuronas. En tres meses, las nuevas neuronas estarán perfectamente conectadas con las demás y no se encuentra ningún rastro de la lesión original. En ensayos futuros, será crucial entender este proceso para conseguir algo similar en el cerebro humano, en el que estas células también están presentes, pero no tienen esa capacidad regeneradora. Si los científicos pueden deducir cómo el cerebro del pez cebra regenera estos tejidos después de sufrir en ellos un daño, debería ser posible obtener los conocimientos necesarios para lograr algo similar en el cerebro humano. También se lo utiliza para estudios sobre nuevas terapias para la enfermedad de Alzheimer, derivadas de esa capacidad regeneradora (Goldsmith y Solari, 2003; Kizil y col., 2012; Spence y col., 2008; Vargesson, 2007; Utne y Smith, 2020).

Identificación en peces

La identificación en estos animales puede hacerse en forma colectiva a través de tarjetas en las que conste la información concerniente al estanque que ocupan y también en forma individual mediante marcas naturales que posean los peces o caravanas en las aletas o cola.

Vías de inoculación y extracción de sangre

Se recomienda colocar una banda de material suave sobre la cabeza para reducir el estrés durante la manipulación de los peces fuera del agua. Los principales métodos de inoculación en los peces son: inmersión en una solución o producto, inyección intraperitoneal (requiere que el animal tenga más de 15 g de peso), inyección intramuscular (principalmente para vacunas de ADN) y administración oral (Bowden y col., 2003a; Klesius y col., 2004). Otros métodos que se han investigado son: el baño, en el cual los peces se exponen al producto por inmersión en el mismo sitio de cultivo, la infiltración anal y el método de spray (Bowden y col., 2003a).

Inoculación por inmersión

Es un método ideal para tratar gran número de peces pequeños (Bowden y col., 2003a; Klesius y col., 2004; Evans y col., 2004). En el tratamiento por inmersión los peces se sumergen en una solución de producto concentrado, este método es más usado que el oral y normalmen-

te proporciona mejores resultados, posiblemente por la mejor absorción del fármaco a través de la piel y/o las branquias evitándose la degradación del mismo en el estómago y además porque algunos antígenos bacterianos utilizados en vacunas ingresan a través de la mucosa gastrointestinal (Bowden y col., 2003a; Klesius, 2004).

Administración oral

La vía oral es el método ideal en acuicultura por la facilidad del procedimiento, por los relativos costos bajos y porque no causa ningún tipo de estrés a los peces, sumado a la posibilidad de tratar grandes poblaciones de peces pequeños en corto tiempo (Bowden y col., 2003^a). Otra ventaja adicional, es la estimulación de inmunidad en las mucosas. Sus principales inconvenientes son la dificultad para determinar la dosis consumida por cada pez, y la necesidad de proteger algunos componentes de la dosis para evitar que se destruyan en el agua o en el estómago de estos animales (Bowden y col., 2003a).

Vía intraperitoneal

Se realiza inoculando en la región posterior abdominal del cuerpo y por debajo de la línea media. Es una vía muy utilizada y la más efectiva para inducir una respuesta inmune, asegura una dosis idéntica en todos los individuos y permite el agregado de adyuvantes que estimulan protección por más tiempo. Sin embargo, los costos y las dificultades de implementación, el estrés excesivo que provoca en los peces, sumado a la poca viabilidad en peces pequeños, y a la estimulación deficiente de inmunidad de superficies, hacen que la inyección de productos a través de esta vía se limite a ciertas especies de peces (Bowden y col, 2003^a).

Vía intramuscular

La vía intramuscular se realiza sobre el lateral superior por encima de la línea media y es poco utilizada a excepción de algunos trabajos experimentales con bacterias en los que se evalúan vacunas experimentales basadas en tecnología de DNA. La investigación sobre vacunas recombinantes se ha enfocado en la estimulación de la protección contra agentes virales como el virus de la pancreatitis necrótica infecciosa (Klesius y col., 2000).

Extracción de sangre

En el pez vivo se obtiene previa anestesia del animal. El anestésico más utilizado es el MS222 (tricain metanosulfonato), que se administra disuelto en el agua en proporción de 1:20.000. Cuando el animal empieza a perder los reflejos, se le saca del agua y se le sitúa en posición lateral. La sangre puede obtenerse de diversos lugares:

Punción directa del corazón

Muy utilizada en sangrado a blanco (Klesius y col., 2000).

Punción de la vena craneal

Es necesario adquirir una buena práctica para poder realizarla y se utiliza para pequeños volúmenes.

Punción de la vena caudal

Es la más utilizada y se encuentra inmediatamente por encima del riñón, adosada a la columna vertebral, puede accederse a la misma desde los flancos del pez o desde la parte inferior por delante del pedúnculo caudal.

Se inserta la aguja inmediatamente por debajo de la línea media del pez, en el tercio posterior del cuerpo y se extrae la sangre. Esta operación ha de ser lo más rápida posible, con el objeto de devolver el pez al agua en un espacio corto de tiempo. Se debe recordar que los eritrocitos del pez, a diferencia de los eritrocitos de mamíferos, presentan núcleo.

Referencias

- Bowden T, Bricknell I, Ellis A. (2003a). Fish Vaccination, an overview. Industry report IntraFish.5-20.
- Canadian Council on Animal Care (2005). Guidelines on the care and use of fish in research, teaching and testing. Ottawa, Ontario. Also available at: www.ccac.ca (7) (PDF) *The welfare of fish*. Available from: https://www.researchgate.net/publication/6259435_The_welfare_of_fish
- Goldsmith P. & Solari, R. (2003). The role of zebrafish in drug discovery Drug Discovery World: Spring 2003.
- Håstein T, Scarfe A, Lund V. (2005). Science-based 1 assessment of welfare: aquatic animals. Rev Sci Tech Off Int Epizoot 24:529–547
- Huntingford F, Adams C, Braithwaite V, Kadri S, Pottinger T, Sandøe P, Turnbull J. (2006). Current issues in fish welfare. J Fish Biol 68:332– 372 (7) (PDF) *The welfare of fish*. Available from: https://www.researchgate.net/publication/6259435_The_welfare_of_fish
- Kizil C, Kaslin J, Kroehne V, Brand M. (2012). Adult neurogenesis and brain regeneration in zebrafish. Dev Neurobiol. Mar;72(3):429-61.DOI:10.1002/dneu.20918.
- Klesius P, Evans J, Shoemaker C. (2004). Warmwater fish vaccinology in catfish production. Anim Health Res Rev. 5:305-311.
- Spence R., Gerlach G, Lawrence C. & Smith C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio* Biological Reviews 83 (1), p13-34.
- Utne A, Smith P. 2020. Fish as Laboratory Animals. The Welfare of Fish DOI: 10.1007/978-3-030-41675-1_16
- Vargesson N. (2007). Zebrafish in Manual of Animal Technology (ed. S. Barnett) Blackwell Publishing Ltd: Oxford, UK.