

Artículos de Revisión

Uso del pez cebra (*Danio rerio*) como especie modelo para la investigación en Biomedicina

Use of zebrafish (*Danio rerio*) as a model species for biomedical research

Jairo Galarza-Pichucho¹  , Ariel Arévalo Cuaical¹  , Francis Ruano-Rivadeneira¹  ,
Daniela Zurita-Paredes¹  , Andrés Romero-Carvajal^{1*}  

¹ Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Escuela de Ciencias Biológicas Quito, Ecuador.

DOI: <https://doi.org/10.26807/remcb.v46i1.1039> | *Autor de correspondencia: maromero@puce.edu.ec
Fecha de envío: 01/01/2025 | Fecha de aceptación: 01/05/2025 | Fecha de publicación: 30/05/2025

Resumen.- El pez cebra (*Danio rerio*) es una especie de laboratorio usada mundialmente para el biodescubrimiento y la investigación biomédica experimental. Esta especie posee un genoma secuenciado y presenta facilidades para la manipulación genética que permite modelar enfermedades humanas crónicas, infecciosas y cáncer en ensayos preclínicos. Al ser más pequeños y de alta fecundidad, el manejo de este pez es económico en comparación con modelos de mamíferos. La facilidad de manipulación de embriones y larvas que se desarrollan en medios de cultivo permite el reemplazo, reducción y refinamiento en el uso de animales adultos para investigación. Estas características también facilitan su uso para ensayos masivos de cribado (*screening*) mutagénicos, toxicológicos o de biodescubrimiento. Esta revisión busca resumir los puntos más importantes sobre el manejo y experimentación en el pez cebra.

Palabras clave: biomedicina, embriogénesis, ensayos preclínicos, pez cebra, regeneración

Abstract.- The zebrafish (*Danio rerio*) is a laboratory species used worldwide for biodiscovery and biomedical experimental research. This species has a sequenced genome and allow genetic manipulation; thus, it is commonly used to model human chronic and infectious diseases, and cancer in preclinical assays. Since zebrafish are small and have high fecundity, its management is more cost-efficient compared to mammalian models. The ease of manipulation of embryos and larvae that grow in a culture medium is consistent with the replacement, reduction and refinement in the use of animal species for research. These characteristics also allow their use in massive mutagenic, toxicological and biodiscovery screenings. This review intends to summarize the most important points regarding management and experimentation in zebrafish.

Keywords: biomedicine, embryogenesis, preclinical assays, zebrafish, regeneration

Introducción

El pez cebra (*Danio rerio*) es un pez tropical de agua dulce, que habita en cuerpos de agua cálidos, claros, lénticos o de poco movimiento, del sur de Asia, en las llanuras aluviales de India, Pakistán, Nepal y Bangladesh (Arunachalam et al. 2013; Engeszer et al. 2007; McClure et al. 2006; Spence et al. 2007; Suriyampola et al. 2016). A principios del siglo veinte, esta especie se introdujo a Europa para



Como citar este artículo: Galarza-Pichucho J, Arévalo Cuaical A, Ruano-Rivadeneira F, Zurita-Paredes D, Romero-Carvajal A. 2025. Uso del pez cebra (*Danio rerio*) como especie modelo para la investigación en Biomedicina. Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas 46(1): 31-46. doi:10.26807/remcb.v46i1.1039



volverse una de las más comunes en acuarios y, en 1934, ya se reconocía su utilidad como especie de laboratorio: el bajo costo, facilidad de manejo, alta fecundidad y rápido desarrollo (Creaser 1934). Durante el siglo pasado, los peces cebra fueron usados esporádicamente en embriología descriptiva y toxicología, pero solo fueron establecidos como especie de laboratorio gracias a los pioneros en genética molecular George Streisinger en Oregón (EE. UU.) y Christiane Nüsslein-Volhard en Tübingen (Alemania) (Eisen 2020; Grunwald y Eisen 2002). Los trabajos fundamentales de Streisinger lograron establecer técnicas para análisis genético, el análisis clonal de las células e incluso la optimización de los cuidados y cría (Chakrabarti et al. 1983; Streisinger et al. 1989, 1981; Walker y Streisinger 1983). El grupo de investigación establecido en Oregón también fue el primero en generar mutantes y en demostrar la capacidad de los peces cebra para asimilar moléculas de ADN extrañas, replicarlas y transmitir las a la siguiente generación, al crearse los primeros peces transgénicos (Stuart et al. 1988). El establecimiento de métodos de manipulación genética en el pez cebra inspiraron a Nüsslein-Volhard, unos años antes de ganar el premio Nobel, a iniciar el primer ensayo de mutagénesis masiva y cribado en un vertebrado, “The Big Screen” (Haffter et al. 1996; Nüsslein-Volhard 2012). El éxito de este ensayo masivo de mutagénesis se debió a otra característica clave de los peces cebra, la translucidez de sus embriones y larvas. La capacidad de observar células y tejidos internos simplemente usando microscopía de contraste permitió asociar más de mil mutaciones a múltiples procesos del desarrollo embrionario, desde la activación del genoma cigótico, gastrulación, neurulación, organogénesis, neurogénesis, etc. (Kimmel y Warga 1988; Nüsslein-Volhard 2012). En adelante, el pez cebra se ha adaptado a la gran mayoría de avances biotecnológicos que han permitido manipular su genoma para obtener silenciamiento dirigido (CRISPR-CAS9, TALEN, nucleasas Zn-finger), expresión y silenciamiento condicional, marcaje de proteínas, marcaje molecular, entre otros (Sharma et al. 2021; Zu et al. 2013).

La importancia biomédica del pez cebra radica en una equivalencia anatómica, genómica y funcional con los humanos (Veldman y Lin 2008). Así, el 70 % de los genes humanos tienen un ortólogo en el pez cebra; equivalencia que supera el 80 % al comparar ortólogos de genes asociados a enfermedades (Howe et al. 2013). Los peces cebra también poseen los mismos mecanismos de regulación epigenética que los humanos (Long et al. 2013). Estas similitudes son importantes para estudiar en vivo procesos fisiopatológicos y permiten encontrar potenciales curas. La presente revisión bibliográfica busca compilar información esencial, técnica y ética, sobre el uso del pez cebra en laboratorios de investigación. Al mismo tiempo, revisa estrategias actuales usadas para el estudio del desarrollo embrionario, regeneración y la aplicación de esta especie en ensayos toxicológicos y teratogénicos en ensayos preclínicos.

El fenotipo silvestre, líneas de laboratorio y genómica

El pez cebra pertenece al género *Danio*, clasificado dentro de la familia Cyprinidae (Hamilton 1822). Los adultos de esta especie son fusiformes, con una longitud estándar de entre 18 y 37 mm (Singleman y Holtzman 2014). El nombre común de esta especie se debe al patrón bilateral de pigmentación, con bandas oscuras y plateadas-doradas intercaladas que se extienden a la aleta caudal (Johnson et al. 1995; Owen et al. 2020). Los machos tienen el vientre recto y en las bandas claras resalta el color dorado, mientras que las hembras poseen el vientre más abultado y en las bandas claras resalta el plateado (Figura 1)

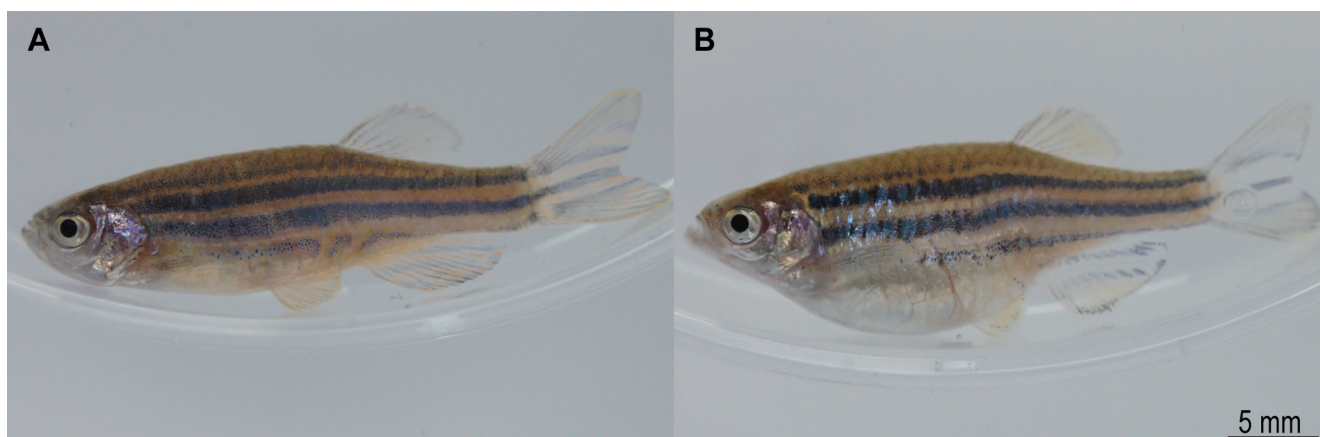


Figura 1. Individuos adultos de pez cebra de la cepa (AB). (A) Macho adulto. (B) Hembra adulta. Fuente: Galarza-Pichucho, Arévalo Cuaical, Ruano-Rivadeneira, Daniela Zurita-Paredes y Andrés Romero-Carvajal. Los autores de este artículo.

Actualmente están registradas veintidós variedades de laboratorio que presentan el fenotipo similar al tipo silvestre de pez cebra (líneas estándar; The Zebrafish Information Network 2024). Las líneas más usadas para investigación son AB, TU, TL y WIK. La línea AB fue generada a partir de peces cebra de dos tiendas de mascotas (tienda A y tienda B), usadas para generar ginogenotes (Streisinger et al. 1981). La línea TU fue generada por Nüsslein-Volhard a partir de peces de varias tiendas de mascotas de Tübingen (Haffter et al. 1996). Para cualquiera de las líneas actualmente disponibles, se requiere de múltiples cruces de parentales y varias generaciones seleccionadas contra mutaciones deletéreas (Trevarrow y Robison 2004). Gracias a un sinnúmero de experimentos de mutación, ahora existen 52 000 fenotipos para 7 055 alelos mutantes de 4 895 genes y el objetivo es obtener alelos mutantes para todos los genes codificantes para proteínas (Bradford et al. 2022). Al igual que cualquier organismo con mutaciones mapeadas al genoma de referencia, existe una nomenclatura para líneas tipo silvestre, cepas mutantes y transgénicos (Bradford et al. 2022). El pez cebra es una especie diploide con un número cromosómico de 25 ($2n = 50$), su genoma tiene más de 1 400 Mb y se han registrado aproximadamente 26 000 genes codificantes para proteínas, con un número importante de genes especie-específicos (Howe et al. 2013).

Estándares de manejo y cría en laboratorios de investigación

Ética y regulaciones respecto al manejo y cría de peces cebra en Ecuador

Los peces cebra son vertebrados con sistemas somatosensoriales derivados, por lo que se considera que sufren dolor y estrés más allá de la duda razonable (Sneddon et al. 2024). El manejo y cría de peces cebra, al igual que el de cualquier animal de laboratorio, debe regirse por estándares éticos y regulaciones legales. Dentro de los estándares éticos se encuentran máximas como la no maleficencia, no crueldad y el respeto a la vida, así como dos principios: el de maximizar la utilidad de la investigación y el principio de las tres erres (reemplazar, reducir y refinar el uso) para minimizar el daño (dolor y distrés) causado (Brown 2013). La Organización Mundial de Sanidad Animal (WOAH en inglés), basada en estos principios éticos, presenta estándares procedimentales a manera de códigos para especies terrestres y acuáticas. En estos códigos se define la necesidad de regulación del uso de animales de investigación por una autoridad gubernamental competente y la evaluación ética de los procesos de investigación por comités de expertos conocidos como IACUC (Institutional Animal Care And Use Committee) (WHO A 2024). Hay que resaltar que el manual de la WHOA para organismos acuáticos no tiene una sección para organismos acuáticos de investigación.

En Ecuador, el artículo 244 del Reglamento General de la Ley Orgánica de Sanidad Agropecuaria, (2019) establece que el ente regulador del uso de animales de investigación es La Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (AGROCALIDAD). Esta agencia emitió, en 2021, la resolución 227 en la que definen reglamentos para la conformación y aprobación de comités de ética para la investigación en animales (CEIA). En la misma resolución, en el Anexo 2, se establecen los estándares que deben cumplir los bioterios para animales de investigación, basándose en la normativa de la WHOA para animales terrestres (AGROCALIDAD Resolución 277, 2021; WHOA 2024). En Ecuador, no existen guías ni estándares oficiales de cría y manejo de animales acuáticos para investigación. Para comparar, en Estados Unidos, las regulaciones legales dejan al IACUC establecer los estándares más apropiados para bioterios, basándose la guía de uso de animales de laboratorio de Garber y colaboradores (2011). Esta guía posee recomendaciones generales tanto para especies terrestres como acuáticas, sobre las que el Instituto Nacional de Salud (NIH) y los IACUC crean normas básicas (Cartner et al. 2020). Todas estas guías poseen procedimientos actualizados para la anestesia, analgesia y manejo del dolor (Sneddon et al. 2024).

Las regulaciones internacionales actuales para el uso de animales acuáticos de investigación se basan en parámetros estándar que satisfacen las necesidades físicas y de comportamiento de un animal. Se debe entonces garantizar las condiciones apropiadas para el alojamiento (calidad de agua, temperatura, iluminación), sanidad (higiene y prevención y control de enfermedades) y nutrición (acceso al agua y a la comida; Garber et al. 2011). A continuación, revisaremos estos parámetros.

Parámetros fisicoquímicos y calidad del agua

Los parámetros fisicoquímicos del agua regulan todos los procesos fisiológicos y comportamentales del pez cebra. Cambios en uno o varios de estos parámetros provocan respuestas de estrés, trastornos crónicos y cambios en fecundidad (Hammer 2020; Pavlidis et al. 2013; Zahangir et al. 2015). Los parámetros comparados en la Tabla 1 son el resultado de múltiples intentos de imitar las condiciones naturales de temperatura, acidez, conductividad, claridad del agua (Aleström et al. 2020; Engeszer et al. 2007). Al mismo tiempo, restringir la variabilidad en los parámetros al mínimo en el laboratorio permite asegurar la reproducibilidad experimental, evitar el crecimiento de patógenos y evitar la acumulación de moléculas tóxicas (Hammer 2020).

El diseño apropiado de peceras (Figura 2), sistemas de cría con recirculación de agua (Figura 3) y cuartos de bioterio, permite controlar varios de los parámetros fisicoquímicos del agua y sanidad de las colonias (Cockington 2019). El agua potable en ciudades pobladas de Ecuador generalmente posee cantidades de cloruro libre superiores a los 0.3 mg/L así como de otros minerales que resultan tóxicos para peces cuando hay exposición crónica (Aleström et al. 2020; Cipriani-Avila et al. 2020). Procesos como el aireamiento regular y reposo o el prefiltrado y ósmosis reversa, remueven estos compuestos antes de que el agua entre en contacto con los peces (Hamme 2020). Cuando se usa filtrado por ósmosis reversa, después del filtrado se deben compensar pérdidas en el pH y conductividad (salinidad) suplementando iones bicarbonato y sal marina.

Los desechos de los peces y los microorganismos en el agua provocan el incremento de amoníaco (NH_3), ion amonio (NH_4^+), nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-) en el agua, siendo NH_3 el más tóxico para peces (Murray et al. 2020). Un nivel apropiado de bacterias nitrificantes en el filtro biológico del

tanque o sistema (Figuras 2 y 3) acelera la oxidación de NH_3 a NO_3^- y el cambio de agua regular, reduce las concentraciones de NO_3^- al mínimo. Concentraciones anormales de cloruro libre o compuestos nitrogenados usualmente resultan en cambios en el pH por lo que su monitoreo debe ser diario, mientras que análisis específicos de nitritos, nitratos y cloro pueden ocurrir de forma semanal (Murray et al. 2020).

Tabla 1. Estándares sugeridos en parámetros fisicoquímicos del agua y parámetros ambientales en comparación con los valores descritos para el hábitat natural del pez cebra descrito por Engeszer y colaboradores (2007; fila 1)

Parámetros fisicoquímicos del agua					Parámetros ambientales			Ref.*
Temp. Agua (°C)	pH	Conductiva. (µS/cm)	NO2- (ppm)	NO3- (ppm)	Densidad (Peces / Litro)	Luz / Oscuridad (Horas)	Temp. (°C)	
24 - 38	7.3 - 8.2	10 - 271	NA	NA	NA	NA	NA	(Engeszer et al. 2007)
25 - 29	6.0 - 8.0	NA	NA	NA	5	14/10	26 - 28	(Reed y Jennings 2011)
28.5	6.5 - 8.0	<25mg/l	<0.3	X	4 - 10	14/10	24 - 29	(Aleström et al. 2020)
24-30	7.0 - 8.0	NA	< 0.02	< 200	< 40	14/10	27	(Lawrence 2007)
26 - 29	7.0 - 8.0	200 - 3000	<0.5	<50	5 - 10	14/10	NA	(Cockington 2019; Hammer 2019)
24 - 29	6.5 - 8.0	150 - 1700	<25 mg/l	<0.3 mg/L	3 - 12	14/10	NA	(Del Vecchio et al 2022)

* La guía de Reed y Jennings (2011) pertenece a la Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA) y es usada como el estándar para el manejo de Pez Cebra en el Reino Unido. El texto de Aleström y colaboradores (2020) resume las recomendaciones de la Federación Europea de Asociaciones Científicas para Animales del Laboratorio (FELASA) y la Sociedad Europea para especies acuáticas usadas en Biología y Medicina (EUFishBiomed) para la aplicación de las regulaciones de la Comisión Europea. Hammer (2019) y Cockington (2019) recogen la mayoría de los estándares requeridos por IACUCs de los Estados Unidos, de acuerdo con la guía (Garber et al. 2011).

** NA. Parámetro no revisado y o especificado

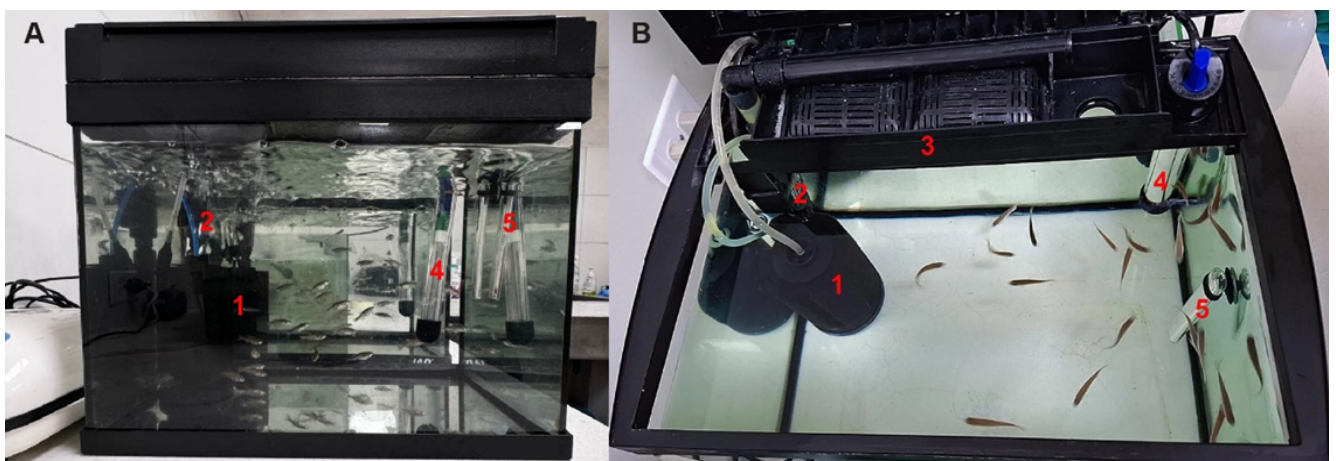


Figura 2. Pecera independiente para cría de peces cebra. 1. Esponja para filtro biológico conectada a la manguera del aireador. 2. Captador y Bomba para recirculación de agua (3). 4. Calentador eléctrico de agua de 100 Watts. 5. Termómetro. Fuente: Galarza-Pichucho, Arévalo Cuaical, Ruano-Rivadeneira, Daniela Zurita-Paredes y Andrés Romero-Carvajal. Los autores de este artículo.



Figura 3. Sistema semiautomático de cría para peces cebra. A. Vista frontal. B. Vista Lateral. 1. Sistema de prefiltrado y ósmosis reversa para el agua de llave. 2. Sumidero para agua filtrada. 3. Sumidero principal para recirculación 4. Lámpara UV para esterilizar el agua recirculada. El agua esterilizada es repartida a cada uno de los tanques de cría (5) y el exceso de agua se derrama al sumidero principal. 6. filtro biológico. 7. Caja de monitoreo de pH y conductividad. 8. Bombas para compensación automática de pH y conductividad usando soluciones concentradas de HCO_3^- o sal de mar artificial almacenados en (9). Las bombas son activadas por la caja de monitoreo. Fuente: Galarza-Pichucho, Arévalo Cuaical, Ruano-Rivadeneira, Daniela Zurita-Paredes y Andrés Romero-Carvajal. Los autores de este artículo.

Peceras y otros estándares de alojamiento

Spence et al. (2007) señalan que las peceras deben tener un tamaño adecuado (entre 3 y 10 litros) y una densidad apropiada para permitir el comportamiento natural de los peces. La sobrepoblación aumenta la cantidad de nitritos y amoníaco, reduce la alimentación efectiva y aumenta la probabilidad de contagio de patógenos (Pavlidis et al. 2013). La temperatura ambiental también debe ser controlada para asegurar temperaturas homogéneas dentro del bioterio de peces (Garber et al. 2011). Para mantener la temperatura del agua se usan calentadores sumergibles correctamente calibrados. Finalmente, el tiempo de luz y oscuridad influye directamente en la reproducción, como se discute abajo, por lo que debe ser controlada (Villamizar et al. 2014).

Higiene, prevención y control de enfermedades

Mycobacterium spp., *Edwardsiella ictaluri* y *Mycoplasma* spp. son los patógenos más dañinos para colonias. Las infecciones con *Mycobacterium* las más comunes y, dependiendo de la especie, las más virulentas y letales (Whipps y Kent 2019). Alteraciones en la calidad de agua y la sobrepoblación también pueden provocar infecciones causadas por bacterias oportunistas como *Aeromonas* spp. y *Pseudomonas* spp., presentes en la mayoría de bioterios (Aleström et al. 2020).

Las infecciones ocurren por el mal manejo del bioterio, alimentos contaminados y el ingreso de individuos contaminados (Whipps y Kent 2019). Es recomendable el uso de alimentación que cumpla estándares microbiológicos (ver abajo) y evitar el ingreso de nuevos individuos al Bioterio. Las medidas de prevención básicas, aparte del control estricto de estándares de alojamiento, incluyen monitorear constantemente la salud de los peces, limpieza y esterilización regular de peceras y componentes, uso de lámparas UV y evitar el contagio externo. Cuando sea necesario importar individuos nuevos, debe existir un cuarto separado de cuarentena para el cuidado y reproducción de nuevos peces (Garber et al. 2011). Solo las larvas de estos cruces pueden ingresar al bioterio. Cuando se detecta un pez enfermo, se sugiere el aislamiento, eutanasia y diagnóstico post-mortem. De confirmarse un proceso infeccioso en el tanque, todos los individuos del tanque deben ser aislados o eutanizados y tanto los tanques como el material en contacto con los peces deben ser esterilizados (Kent et al. 2009).

Los peces cebra, al igual que otros peces de acuario, pueden transmitir patógenos a los humanos. *Mycobacterium* spp. o *Pseudomonas* spp. pueden estar presentes en acuarios e infectar tanto a peces como humanos (Whipps y Kent 2019). Por estos motivos, se exige la aplicación de normas de bioseguridad nivel 2 en el bioterio: uso de guantes y mandil o batas de uso exclusivo, métodos de descontaminación y correcta eliminación de desechos (Kütter et al. 2023).

Alimentación y nutrición

Los peces cebra son omnívoros y, en su hábitat natural, tienen una preferencia alimenticia a larvas de insectos, nematodos entre otros (Engeszer et al. 2007; Meyers 2018). La alimentación adecuada, con productos nutritivos permiten mantener la salud de la colonia, promover el crecimiento, maduración sexual y aplazar la senescencia (Markovich et al. 2007; Watts y D'Abramo 2021).

Los requerimientos nutricionales para el pez cebra aún deben ser estudiados. Ahora sabemos que las proteínas, grasas y vitaminas son los nutrientes más importantes en la dieta; en particular, aminoácidos esenciales, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, vitaminas A, C, D y complejo B (Fowler et al. 2019). Los requerimientos de carbohidratos y fibra son desconocidos, pero, de todas formas, son añadidos a la mayoría de los suplementos nutricionales. Las dietas para el pez cebra se pueden clasificar en dietas vivas y formulaciones sólidas particuladas. Las dietas vivas consisten en organismos vivos cultivados como larvas nauplius de *Artemia* sp., gusanos rotíferos (*Brachionus* sp.) y protozoarios como *Paramecium* spp. y *Tetrahymena* spp. (Martins et al. 2016). Estas dietas, particularmente *Artemia* spp. y rotíferos, contienen la cantidad apropiada de proteínas, lípidos y nutrientes esenciales para la salud, el crecimiento larval y la maduración sexual (Sorgeloos et al. 2001). Las formulaciones particuladas (hojuelas, pellets, polvo) se producen industrialmente para lograr valores nutritivos de proteínas, lípidos, fibra y carbohidratos (Licitra et al. 2024). Las formulaciones con mayor cantidad de proteínas y lípidos son las que mejor promueven el crecimiento de larvas y maduración de juveniles (Fowler et al. 2019). Las dietas vivas requieren de infraestructura de cría y todo alimento debe tener calidad apropiada para evitar infecciones con *Mycobacterium* spp. (Chang et al. 2019).

Reproducción y desarrollo embrionario

Uno de los fines últimos del cuidado de pez cebra es obtener embriones y larvas tempranas para usarlos como unidades experimentales. El apropiado manejo de los parámetros de alojamiento, salud y alimentación acelera la madurez sexual e incrementa la fertilidad y fecundidad de los individuos (Kolkovski et al. 2004). Factores como la temperatura, densidad poblacional y otros factores desconocidos pueden afectar la fecundidad en el pez cebra y provocar la diferenciación sesgada de un sexo u otro en la población (Valdivieso et al. 2020). En el pez cebra, a pesar del dimorfismo sexual, la determinación genética sexual se inicia tardíamente y obedece a complejas relaciones multigénicas y, probablemente, al efecto de la temperatura ambiental (Bradley et al. 2011).

El control del ciclo de luz-oscuridad, la temperatura estable y la alimentación, al parecer, imitan el estímulo ambiental y permiten obtener reproducciones controladas bajo demanda, en cualquier época del año (Engeszer et al. 2007). Para la reproducción controlada, se aíslan peces adultos en tanques de reproducción o parideras, con un nivel de agua más bajo y un piso con una malla (Reed y Jennings 2011). El inicio del periodo de luz desencadena múltiples comportamientos de cortejo, persecución y contacto del macho a la hembra, lo que a su vez provoca la liberación de oocitos maduros en el agua. Estos son rápidamente fertilizados externamente por el macho, que libera esperma al mismo tiempo. Los huevos fertilizados caen por la malla y se acumulan en el fondo del tanque (Castranova y Wang 2019; Nasiadka y Clark 2014). La malla impide que los adultos se alimenten de los huevos liberados.

Desarrollo de embriones

El desarrollo embrionario del pez cebra toma entre 48 y 72 horas, desde la fertilización hasta la eclosión de la larva (Kimmel et al. 1995). Los oocitos de esta especie contienen gran cantidad de yema, de consistencia rígida (telolecítico) que empuja al núcleo haploide hacia un extremo (Fuentes et al. 2018). Cuando ocurre la fertilización, el citoesqueleto mueve la yema hacia un extremo (polo vegetal) y deja al citoplasma del cigoto visible (polo animal) (Shamipour et al.) 2019). Las divisiones celulares solo ocurren en la membrana sobre este citoplasma, generando células incompletas conectadas con la yema (división meroblástica) que se acumulan formando un disco, primero, y luego una capa superior de células en el polo animal que toma el nombre de blastodermo (Figura 4A-4C; Fuentes et al. 2018). Durante la gastrulación, estas células se reorganizan para ubicar a las células progenitoras de la cabeza en la región anterior, mientras se diferencian las capas germinales, ectodermo, mesodermo y endodermo (Keller 2005). Después de esto, el embrión crece hacia posterior, añadiendo más somitas hacia la cola, y se desarrollan todos los órganos de la larva (Figura 4D-4F; Kimmel et al. 1995).

Investigación biomédica **Transgénesis**

Como se muestra en la Figura 4, las larvas de los peces cebra son translúcidas, lo que permite observar con apropiado contraste el desarrollo de tejidos y órganos. Aprovechando la capacidad de los embriones de asimilar ADN exógeno, se puede lograr transgénesis con cierta facilidad (Long et al. 1997). Actualmente, existen numerosas líneas transgénicas en las cuales se ha insertado el gen de una proteína fluorescente controlado bajo un promotor tejido-específico, para que esa proteína se exprese solo en las células de ese tejido (Figura 5).

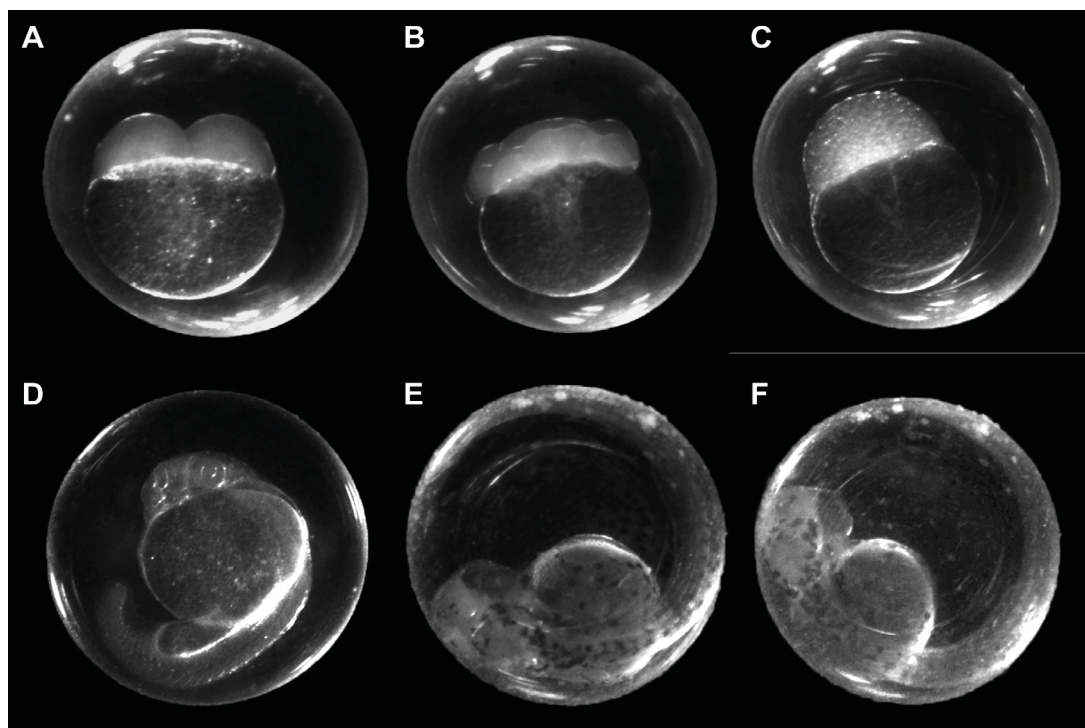


Figura 4. Etapas del desarrollo embrionario del pez cebra. (A) Embrión con 2 células a 0.75 hpf. (B) Embrión con 16 células a 1.50 hpf. (C) Embrión con 512 células a 2.75 hpf. (D) Presencia de somitas a 19.75 hpf. (E) Embrión a 48 hpf. (F) Estadio larvario completo a 72 hpf. Fuente: Galarza-Pichucho, Arévalo Cuaical, Ruano-Rivadeneira, Daniela Zurita-Paredes y Andrés Romero-Carvajal. Los autores de este artículo.

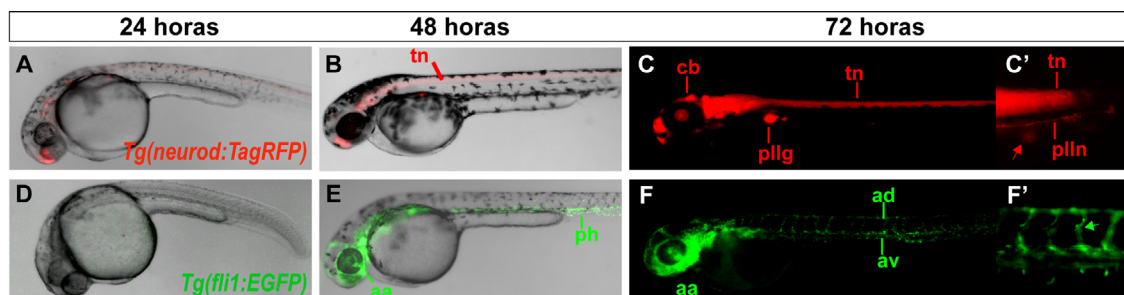


Figura 5. Embriones de dos líneas transgénicas. En A, B y C se muestra una línea en la cual el gen codificante para la proteína roja fluorescente (RFP) se expresa bajo el control del promotor del gen *neuroD*. Todos los progenitores de neuronas, al expresar este gen, expresan RFP, la cual puede ser observada en un microscopio de fluorescencia. El cerebro (cb) y el tubo neural (tn) son las estructuras más visibles. A las 72 horas, se pueden distinguir neuronas, particularmente en el ganglio de la línea lateral (pllg) y sus axones (plln) inervan a los órganos sensoriales (flecha). En C, D y E se muestra una línea en la cual el gen codificante para la proteína verde fluorescente (EGFP) se expresa bajo el control del promotor del gen *fli1*. Todos los progenitores de células endoteliales y progenitores hematopoyéticos (ph, hemangioblastos), al expresar este gen, expresan EGFP. La vasculatura craneal de los arcos aórticos (aa) y los hemangioblastos (ph) solo son visibles a las 48 hrs. A las 72 horas, se distinguen la aorta dorsal (ad) y la aorta ventral (av). Entre ambos vasos, se forma arcos gracias a la presencia de angioblastos (flecha). Fuente: Galarza-Pichucho, Arévalo Cuaical, Ruano-Rivadeneira, Daniela Zurita-Paredes y Andrés Romero-Carvajal. Los autores de este artículo.

Ensayos de cribado y biodescubrimiento

Los embriones y larvas de los peces cebras son altamente permeables al ambiente acuático y pueden asimilar moléculas disueltas en el agua, lo que facilita la entrega de tratamientos en ensayos (Harvey et al. 1983). Esta característica permite diseñar ensayos para descubrir nuevos medicamentos o repotenciar medicamentos existentes, cuyas dosis efectivas pueden probarse en numerosas unidades experimentales isogénicas, dada la fecundidad de los peces (Cassar et al. 2020). Bajo este principio, se puede usar al pez cebra para el estudio de nuevos contaminantes, para la determinación de efectos tóxicos y teratogénicos y para determinar concentraciones límite de cualquier compuesto de interés económico o ambiental (Figura 6) (Ducharme et al. 2013; Yang et al. 2009).



Figura 6. Ensayo de teratogenicidad usando un contaminante ambiental. Entre 5 y 10 embriones de 4 hrs post fertilización son depositados en cada pocillo de una placa de microtitulación. En un ensayo cuadruplicado se observa una respuesta consistente y progresiva al incremento en la concentración del contaminante. El efecto teratogénico consiste en un retraso del desarrollo, falla en la elongación, edema cardíaco, entre otros. Fuente: Galarza-Pichucho, Arévalo Cuaical, Ruano-Rivadeneira, Daniela Zurita-Paredes y Andrés Romero-Carvajal. Los autores de este artículo.

Gracias a la equivalencia genómica y fisiológica, en el pez cebra se pueden modelar múltiples enfermedades crónicas como la hipertensión y el fallo cardíaco por isquemia, dos de las principales causas de muerte en Ecuador (WHO 2024). Así, los genes asociados a estos trastornos, al ser modificados en el pez cebra, provocan disfunción cardíaca e hipertensión en el pez (Narumanchi et al. 2021). El aumento de glucosa y colesterol en la dieta de los peces provoca vasculopatías similares a las que ocurren en humanos y la atorvastatina funciona, tanto en peces como en humanos, como un modulador de la presión arterial (Schlegel 2016). Actualmente, se aprovechan las cualidades de investigación del pez cebra para la prueba y descubrimiento de nuevos fármacos que puedan aliviar o prevenir algunos de estos procesos fisiopatológicos cardiovasculares (Kithcart y MacRae 2017). El cáncer y fenómenos asociados como la vasculogénesis y metástasis también son modelados en peces cebra usando estrategias como la modificación genética de oncogenes y supresores tumorales o el xenotransplante de células cancerosas humanas (Astell y Sieger 2020).

Ensayos de regeneración

A diferencia de los humanos, los peces cebra son capaces de reparar y reemplazar tejidos después de lesiones en el corazón, cerebro, médula espinal, retina, extremidades y tejidos sensoriales (Marques et al. 2019). Para los ensayos de regeneración, se diseña un procedimiento para herir de forma más o menos específica, como cirugías, en el caso del corazón, cerebro y médula espinal (Pronobis y Poss 2020; Zeng et al. 2020). El hígado y las células sensoriales de la línea lateral pueden ser lesionados con agentes químicos con conocido efecto en humanos como el ibuprofeno (hígado) o la estreptomycin, en el caso de la línea lateral (Figura 7; Lush y Piotrowski 2014). Los peces, sean

larvas o adultos, pueden regenerar el tejido perdido en una lesión aguda gracias a múltiples factores como la disponibilidad de células progenitoras (células madre), la activación de programas genéticos de proliferación celular en respuesta a la lesión y el cierre no inflamatorio de la lesión (Marques et al. 2019). El estudio de las capacidades regenerativas del pez cebra pueden proveer pistas sobre nuevas estrategias para recuperar tejidos en humanos.

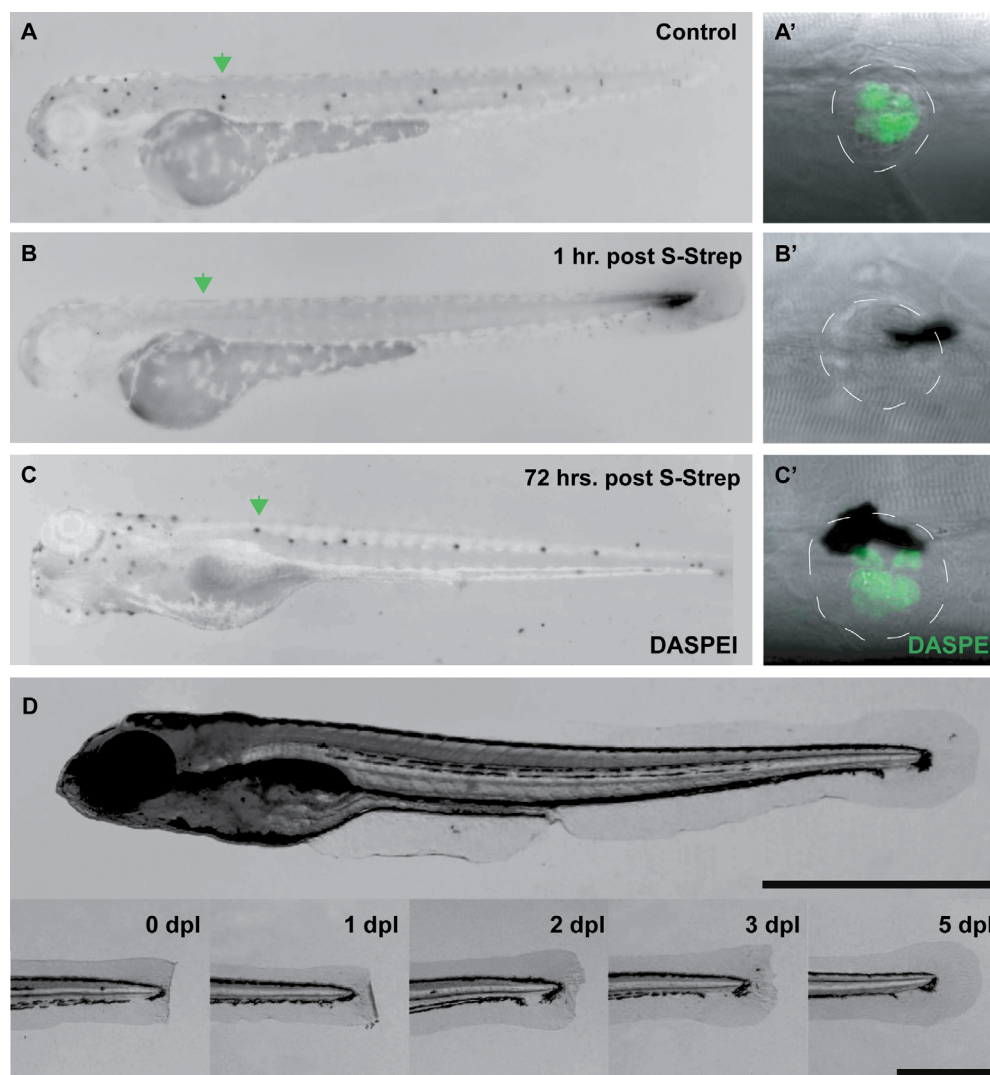


Figura 7. Ensayos de regeneración. A. Las células ciliadas de la línea lateral pueden ser marcadas in vivo y con alta especificidad con el tinte lipofílico DASPEI. Estas células se distribuyen regularmente a lo largo del cuerpo de la larva de 5 días post fertilización (A) y se localizan en la parte central de los neuromastos (A'). El antibiótico Sulfato de Estreptomicina (S-Strep), al igual que otros aminoglucósidos, provoca la muerte de las células ciliadas (B). C. Tanto larvas como peces adultos regeneran el número original de células ciliadas aproximadamente 7 días post tratamiento con S-Strep. D. Ensayo de regeneración de la cola en larvas de 5 días. Las imágenes han sido contrastadas en exceso para poder distinguir el proceso de regeneración en la aleta caudal. La línea punteada indica el sitio de corte. El proceso de regeneración toma aproximadamente 5 días post lesión (dpl). Fuente: Galarza-Pichucho, Arévalo Cuaical, Ruano-Rivadeneira, Daniela Zurita-Paredes y Andrés Romero-Carvajal. Los autores de este artículo.

Financiamiento

Este manuscrito y los resultados presentados fueron desarrollados gracias a los fondos provistos por la Secretaría de Educación Superior, Ciencia y Tecnología del Ecuador SENESCYT, a través de los fondos INEDITA PIC-21-INE-PUCE-001 y por la Corporación Ecuatoriana para el Desarrollo de la Investigación y Academia CEDIA a través del proyecto I+D+I-XVIII-2023-50. Apoyo administrativo y económico también fue provisto por la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Contribución de los autores

J.G-P.: Investigación bibliográfica, adquisición de datos, preparación de tablas comparativas, redacción del borrador original. A.A.C., F.R-R., D.Z-P.: Fotografías de embriones, preparación de figuras, revisión, edición del borrador. A.R.-C.: investigación, conceptualización, visualización, metodología, curación de datos, redacción, revisión y edición, validación, supervisión, adquisición de fondos, administración del proyecto.

Referencias

- AGROCALIDAD. Norma zoosanitaria que establece el reglamento para la conformación, aprobación y el seguimiento de Comités de Ética para la investigación con animales en el Ecuador y bioterios. Resolución 277; 2021. p. 4-17.
- Aleström P, D'Angelo L, Midtlyng PJ, Schorderet DF, Schulte-Merker S, Sohm F, et al. Zebrafish: Housing and husbandry recommendations. *Lab Anim*. 2020;54(3): 213-24. <https://doi.org/10.1177/0023677219869037>
- Arunachalam M, Raja M, Vijayakumar C, Malaïammal P, Mayden RL. Natural history of zebrafish (*Danio rerio*) in India. *Zebrafish*. 2013;10(1):1-14. <https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0803>
- Astell KR, Sieger D. Zebrafish In Vivo Models of Cancer and Metastasis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2020;10(9): a037077. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A037077>
- Bradford YM, Van Slyke CE, Ruzicka L, Singer A, Eagle A, Fashena D, et al. Zebrafish information network, the knowledgebase for *Danio rerio* research. *Genetics*. 2022;220(1): iyac016. <https://doi.org/10.1093/GENETICS/IYAC016>
- Bradley KM, Breyer JP, Melville DB, Broman KW, Knapik EW, Smith JR. An SNP-based linkage map for zebrafish reveals sex determination loci. *G3 (Bethesda)*. 2011;1(1):3-9. <https://doi.org/10.1534/g3.111.000190>
- Brown MJ. Ethics and Animal Welfare. In: *Laboratory Animal Welfare*. London: Academic Press; 2013. p. 7-15. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385103-1.00002-6>
- Cartner SC, Durboraw E, Watts A. Regulations, policies and guidelines pertaining to the use of zebrafish in biomedical research. In: *The Zebrafish in Biomedical Research: Biology, Husbandry, Diseases, and Research Applications*. Amsterdam: Elsevier; 2020. p. 451-9. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812431-4.00038-5>
- Cassar S, Adatto I, Freeman JL, Gamse JT, Iturria I, Lawrence C, et al. Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. *Chem Res Toxicol*. 2020;33(1):95-118. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00335>
- Castranova D, Wang C. Zebrafish breeding and colony management. In: *The Zebrafish in Biomedical Research: Biology, Husbandry, Diseases, and Research Applications*. Amsterdam: Elsevier; 2019. p. 357-64. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812431-4.00031-2>
- Chakrabarti S, Streisinger G, Singer F, Walker C. Frequency of X-ray induced specific locus and recessive lethal mutations in mature germ cells of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Genetics*. 1983;103(1):109-23.
- Chang CT, Benedict S, Whipps CM. Transmission of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium marinum* in laboratory zebrafish through live feeds. *J Fish Dis*. 2019;42(10):1425-31. <https://doi.org/10.1111/jfd.13071>
- Cipriani-Avila I, Molinero J, Jara-Negrete E, Barrado M, Arcos C, Mafla S, et al. Heavy metal assessment in drinking waters of Ecuador: Quito, Ibarra and Guayaquil. *J Water Health*. 2020;18(6):1050-64. <https://doi.org/10.2166/WH.2020.093>
- Cockington J. 2019. Aquatic housing. In: Cartner SC, Eisen JS, Farmer SC, Guillemin KJ, Kent ML, Sanders GE, editors. *The zebrafish in biomedical research: biology, husbandry, diseases, and research applications*. Amsterdam (NL): Elsevier. p. 279-298. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812431-4.00026-9>

- Creaser CW. 1934. The technic of handling the zebra fish (*Brachydanio rerio*) for the production of eggs which are favorable for embryological research and are available at any specified time throughout the year. *Copeia*. 1934(3):159. <https://doi.org/10.2307/1435845>
- del Vecchio G, Mazzei A, Schiavone R, Gomes AS, Frangelli G, Sala T, Fantino S, Brocca MGA, Barca A, Rønnestad I, Verri T. 2022. Rearing conditions and automated feed distribution systems for zebrafish (*Danio rerio*). *Appl Sci*. 12(21):10961. <https://doi.org/10.3390/app122110961>
- Ducharme NA, Peterson LE, Benfenati E, Reif D, McCollum CW, Gustafsson J-Å, Bondesson M. 2013. Meta-analysis of toxicity and teratogenicity of 133 chemicals from zebrafish developmental toxicity studies. *Reprod Toxicol*. 41:98-108. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.06.070>
- Eisen JS. 2020. History of zebrafish research. In: Cartner SC, Eisen JS, Farmer SC, Guillemin KJ, Kent ML, Sanders GE, editors. *The zebrafish in biomedical research: biology, husbandry, diseases, and research applications*. Amsterdam (NL): Elsevier. p. 3-14. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812431-4.00001-4>
- Engeszer RE, Patterson LB, Rao AA, Parichy DM. 2007. Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish*. 4(1):21-40. <https://doi.org/10.1089/zeb.2006.9997>
- Fowler LA, Williams MB, D'Abramo LR, Watts SA. 2019a. Zebrafish nutrition—moving forward. In: Cartner SC, Eisen JS, Farmer SC, Guillemin KJ, Kent ML, Sanders GE, editors. *The zebrafish in biomedical research: biology, husbandry, diseases, and research applications*. Amsterdam (NL): Elsevier. p. 379-401. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812431-4.00033-6>
- Fowler LA, Williams MB, Dennis-Cornelius LN, Farmer S, Barry RJ, Powell ML, Watts SA. 2019b. Influence of commercial and laboratory diets on growth, body composition, and reproduction in the zebrafish *Danio rerio*. *Zebrafish*. 16(6):508-521. <https://doi.org/10.1089/zeb.2019.1742>
- Fuentes R, Mullins MC, Fernández J. 2018. Formation and dynamics of cytoplasmic domains and their genetic regulation during the zebrafish oocyte-to-embryo transition. *Mech Dev*. 154:259-269. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2018.08.001>
- Garber J, Barbee R, Bielitzki J, Clayton L, Donovan J, Hendriksen C. 2011. *Guide for the care and use of laboratory animals*. Washington (DC): National Academy Press.
- Grunwald D, Eisen J. 2002. Headwaters of the zebrafish—emergence of a new model vertebrate. *Nat Rev Genet*. 3(9):711-717. <https://doi.org/10.1038/nrg891>
- Haffter P, Granato M, Brand M, Mullins MC, Hammerschmidt M, Kane DA, Odenthal J, van Eeden FJ, Jiang YJ, Heisenberg CP, et al. 1996. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*. 123:1-36. <https://doi.org/10.1242/dev.123.1.1>
- Hamilton F. 1822. *An account of the fishes found in the river Ganges and its branches*. Edinburgh (UK): A. Constable and Company. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.6897>
- Hammer HS. 2020. Water quality for zebrafish culture. In: Cartner SC, Eisen JS, Farmer SC, Guillemin KJ, Kent ML, Sanders GE, editors. *The zebrafish in biomedical research*. Amsterdam (Netherlands): Elsevier. p. 321-335. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812431-4.00029-4>
- Harvey B, Kelley RN, Ashwood-Smith MJ. 1983. Permeability of intact and dechorionated zebra fish embryos to glycerol and dimethyl sulfoxide. *Cryobiology*. 20(4):432-439. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(83\)90033-0](https://doi.org/10.1016/0011-2240(83)90033-0)
- Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, Collins JE, Humphray S, McLaren K, Matthews L, et al. 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. 496(7446):498-503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>
- Johnson SL, Africa D, Walker C, Weston JA. 1995. Genetic control of adult pigment stripe development in zebrafish. *Dev Biol*. 167(1):27-33. <https://doi.org/10.1006/dbio.1995.1004>

- Keller R. 2005. Cell migration during gastrulation. *Curr Opin Cell Biol.* 17(5):533–541. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.08.006>
- Kent ML, Feist SW, Harper C, Hoogstraten-Miller S, Law JM, Sánchez-Morgado JM, Tanguay RL, Sanders GE, Spitsbergen JM, Whipps CM. 2009. Recommendations for control of pathogens and infectious diseases in fish research facilities. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 149(2):240–248. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.08.001>
- Kimmel CB, Warga RM. 1988. Cell lineage and developmental potential of cells in the zebrafish embryo. *Trends Genet.* 4(3):68–74. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(88\)90043-1](https://doi.org/10.1016/0168-9525(88)90043-1)
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn.* 203(3):253–310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
- Kithcart A, MacRae CA. 2017. Using zebrafish for high-throughput screening of novel cardiovascular drugs. *JACC Basic Transl Sci.* 2(1):1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2017.01.004>
- Kolkovski S, Curnow J, King J. 2004. Intensive rearing system for fish larvae research II: Artemia hatching and enriching system. *Aquac Eng.* 31(3–4):309–317. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2004.05.005>
- Kütter MT, Barcellos LJG, Boyle RT, Marins LF, Silveira T. 2023. Good practices in the rearing and maintenance of zebrafish (*Danio rerio*) in Brazilian laboratories. *Cienc Anim Bras.* 24:e74134. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v24e-74134e>
- Lawrence C. 2007. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): a review. *Aquaculture.* 269(1–4):1–20. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.077>
- Licitra R, Fronte B, Verri T, Marchese M, Sangiacomo C, Santorelli FM. 2024. Zebrafish feed intake: a systematic review for standardizing feeding management in laboratory conditions. *Biology (Basel).* 13(4):209. <https://doi.org/10.3390/biology13040209/s1>
- Long HK, Sims D, Heger A, Blackledge NP, Kutter C, Wright ML, Grützner F, Odom DT, Patient R, Ponting CP, Klose RJ. 2013. Epigenetic conservation at gene regulatory elements revealed by non-methylated DNA profiling in seven vertebrates. *Elife.* 2: e00348. <https://doi.org/10.7554/elife.00348>
- Long Q, Meng A, Wang H, Jessen JR, Farrell MJ, Lin S. 1997. GATA-1 expression pattern can be recapitulated in living transgenic zebrafish using GFP reporter gene. *Development.* 124(20):4105–4111.
- Lush ME, Piotrowski T. 2014. Sensory hair cell regeneration in the zebrafish lateral line. *Dev Dyn.* 243:1187–1202. <https://doi.org/10.1002/dvdy>
- Markovich ML, Rizzuto NV, Brown PB. 2007. Diet affects spawning in zebrafish. *Zebrafish.* 4:69–74. <https://doi.org/10.1089/zeb.2006.9993>
- Marques IJ, Lupi E, Mercader N. 2019. Model systems for regeneration: Zebrafish. *Development.* 146:dev167692. <https://doi.org/10.1242/dev.167692>
- Martins S, Monteiro JF, Vito M, Weintraub D, Almeida J, Certal AC. 2016. Toward an integrated zebrafish health management program supporting cancer and neuroscience research. *Zebrafish.* 13(Suppl 1):S47–S55. <https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1198>
- McClure MM, McIntyre PB, McCune AR. 2006. Notes on the natural diet and habitat of eight danionin fishes, including the zebrafish *Danio rerio*. *J Fish Biol.* 69:553–570. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2006.01125.x>
- Meyers JR. 2018. Zebrafish: development of a vertebrate model organism. In: *Current Protocols in Essential Laboratory Techniques*. Blackwell Publishing Inc. p. 1–26. <https://doi.org/10.1002/cpet.19>
- Murray KN, Lains D, Spagnoli ST. 2020. Water quality and idiopathic diseases of laboratory zebrafish. In: Cartner SC, Eisen JS, Farmer SC, Guillemain K, Kent ML, Sanders GE, editors. *The zebrafish in biomedical research: biology, husbandry, diseases, and research applications*. Academic Press. p. 463–477. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812431-4.00039-7>

- Narumanchi S, Wang H, Perttunen S, Tikkanen I, Lakkisto P, Paavola J. 2021. Zebrafish heart failure models. *Front Cell Dev Biol.* 9:662583. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.662583>
- Nasiadka A, Clark MD. 2014. Zebrafish breeding in the laboratory environment. *ILAR J.* 53:161-168. <https://doi.org/10.1093/ilar.53.2.161>
- Nüsslein-Volhard C. 2012. The zebrafish issue of Development. *Development.* 139:4099-4103. <https://doi.org/10.1242/dev.085217>
- Owen JP, Kelsh RN, Yates CA. 2020. A quantitative modelling approach to zebrafish pigment pattern formation. *Elife.* 9: e52998. <https://doi.org/10.7554/elife.52998>
- Pavlidis M, Digka N, Theodoridi A, Campo A, Barsakis K, Skouradakis G, Samaras A, Tsalafouta A. 2013. Husbandry of zebrafish, *Danio rerio*, and the cortisol stress response. *Zebrafish.* 10:524-531. <https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0819>
- Pronobis MI, Poss KD. 2020. Signals for cardiomyocyte proliferation during zebrafish heart regeneration. *Curr Opin Physiol.* 14:78-85. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2020.02.002>
- Reed B, Jennings M. 2011. Guidance on the housing and care of zebrafish. Research Animals Department, RSPCA.
- Schlegel A. 2016. Zebrafish models for dyslipidemia and atherosclerosis research. *Front Endocrinol (Lausanne).* 7:159. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00159>
- Shamipour S, Kardos R, Xue SL, Hof B, Hannezo E, Heisenberg CP. 2019. Bulk actin dynamics drive phase segregation in zebrafish oocytes. *Cell.* 177:1463-1479.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.030>
- Sharma P, Sharma BS, Verma RJ. 2021. CRISPR-based genome editing of zebrafish. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science.* Elsevier B.V. p. 69-84. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2021.01.005>
- Singleman C, Holtzman NG. 2014. Growth and maturation in the zebrafish, *Danio rerio*: a staging tool for teaching and research. *Zebrafish.* 11:396-406. <https://doi.org/10.1089/zeb.2014.0976>
- Sneddon LU, Schroeder P, Roque A, Finger-Baier K, Fleming A, Tinman S, Collet B. 2024. Pain management in zebrafish: report from a FELASA Working Group. *Lab Anim.* 58:261-276. <https://doi.org/10.1177/00236772231198733>
- Sorgeloos P, Dhert P, Candreva P. 2001. Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture.* 200:147-159. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00698-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00698-6)
- Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. 2007. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 83:13-34. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.2007.00030.x>
- Streisinger G, Coale F, Taggart C, Walker C, Grunwald DJ. 1989. Clonal origins of cells in the pigmented retina of the zebrafish eye. *Dev Biol.* 131:60-69.
- Streisinger G, Walker C, Dower N, Knauber D, Singer F. 1981. Production of clones of homozygous diploid zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Nature.* 291:293-296. <https://doi.org/10.1038/291293a0>
- Stuart GW, McMurray JV, Westerfield M. 1988. Replication, integration and stable germ-line transmission of foreign sequences injected into early zebrafish embryos. *Development.* 103:403-412.
- Suriyampola PS, Shelton DS, Shukla R, Roy T, Bhat A, Martins EP. 2016. Zebrafish social behavior in the wild. *Zebrafish.* 13:1-8. <https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1159>
- The Zebrafish Information Network. 2024. Wild-type lines. Disponible: <https://zfin.org/action/feature/wildtype-list>
- Trevarrow B, Robison B. 2004. Genetic backgrounds, standard lines, and husbandry of zebrafish. *Methods Cell Biol.* 77:599-616. [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(04\)77032-6](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(04)77032-6)

- Valdivieso A, Ribas L, Monleón-Getino A, Orbán L, Piferrer F. 2020. Exposure of zebrafish to elevated temperature induces sex ratio shifts and alterations in the testicular epigenome of unexposed offspring. *Environ Res.* 186:109601. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109601>
- Veldman MB, Lin S. 2008. Zebrafish as a developmental model organism for pediatric research. *Pediatr Res.* 64:470-476. <https://doi.org/10.1203/pdr.Ob013e318186e609>
- Villamizar N, Vera LM, Foulkes NS, Sánchez-Vázquez FJ. 2014. Effect of lighting conditions on zebrafish growth and development. *Zebrafish.* 11:173-181. <https://doi.org/10.1089/zeb.2013.0926>
- Walker C, Streisinger G. 1983. Induction of mutations by γ -rays in pregonial germ cells of zebrafish embryos. *Genetics.* 103:125-136.
- Watts SA, D'Abramo LR. 2021. Standardized reference diets for zebrafish: addressing nutritional control in experimental methodology. *Annu Rev Nutr.* 41:511-527. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-120420-034809>
- Whipps CM, Kent ML. 2019. Bacterial and fungal diseases of zebrafish. In: Cartner SC, Eisen JS, Farmer SC, Guillemin K, Kent ML, Sanders GE, editors. *The zebrafish in biomedical research: biology, husbandry, diseases, and research applications*. Elsevier. p. 495-508. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812431-4.00041-5>
- World Health Organization (WHO) 2024. Ecuador. Disponible: <https://data.who.int/countries/218>
- World Organisation for Animal Health (WOAH) 2024. Capítulo 7.8. Utilización de animales en la investigación y educación. Código Sanitario para los Animales Terrestres. Disponible: <https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-codigo-terrestre>
- World Organisation for Animal Health (WOAH) 2024. Health data overview for the Republic of Ecuador. Disponible: <https://data.who.int/countries/218>
- Yang L, Ho NY, Alshut R, Legradi J, Weiss C, Reischl M, Mikut R, Liebel U, Müller F, Strähle U. 2009. Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. *Reprod Toxicol* 28:245-253. <https://doi.org/10.1016/J.REPROTOX.2009.04.013>
- Zahangir MM, Haque F, Mostakim GM, Islam MS. 2015. Secondary stress responses of zebrafish to different pH: Evaluation in a seasonal manner. *Aquac Rep* 2:91-96. <https://doi.org/10.1016/J.AQREP.2015.08.008>
- Zeng CW, Sheu JC, Tsai HJ. 2020. The neuronal regeneration of adult zebrafish after spinal cord injury is enhanced by transplanting optimized number of neural progenitor cells. *Cell Transplant* 29. <https://doi.org/10.1177/0963689720903679>
- Zu Y, Tong X, Wang Z, Liu D, Pan R, Li Z, Hu Y, Luo Z, Huang P, Wu Q, Zhu Z, Zhang B, Lin S. 2013. TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish. *Nat Methods* 10:329-331. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2374>