

## Pez cebra (*Danio rerio*) y anestesia. Un modelo animal alternativo para realizar investigación biomédica básica.

<sup>1</sup>Rafael Antonio Vargas-Vargas. <sup>1</sup>Profesor asistente. MD-MSc-PhD. Departamento de Ciencias Fisiológicas. Facultad de Medicina Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá Colombia.

rafael.vargas@javeriana.edu.co rvargas3200@hotmail.com

### Resumen

La investigación biomédica básica es una necesidad en el campo de la salud, pues muchas sustancias y procedimientos son evaluados para garantizar el beneficio de los pacientes, en quienes finalmente serán empleados. Sin embargo existen limitaciones en nuestros países para realizar este tipo de investigación, debido a la alta inversión que demanda, especialmente debido a la infraestructura y el cuidado que los modelos animales tradicionales empleados requieren, los cuales deben cumplir con normas bioéticas específicas. El contar con un modelo animal de bajo costo y alta versatilidad puede fomentar la investigación preclínica en especial en el área de anestesiología.

El pez cebra es un modelo animal emergente con muchas cualidades que lo posicionan como una alternativa atractiva para realizar investigación biomédica básica: tiene alta fecundidad, posee un desarrollo rápido desde el estadio embrionario hasta adulto y el costo de la infraestructura, los insumos y los reactivos necesarios para su crianza y reproducción son bajos. El presente trabajo es una revisión narrativa que muestra estudios que han empleado peces para investigación de fármacos y protocolos de anestesia. De igual forma se presentan las características generales del pez cebra y algunos trabajos de investigación básica en el campo de la anestesiología en los cuales se ha empleado como animal de experimentación. Esta información puede ser útil para profesionales e investigadores del área de la anestesiología interesados en realizar investigación biomédica básica con el pez cebra como modelo de estudio.

**Palabras clave:** Pez cebra, anestesiología, investigación biomédica básica, anestésicos, modelos animales

### Abstract.

Basic biomedical research is a necessity in the health field, in order to evaluate diverse substances and procedures and to ensure the benefit of patients who will employ them. However there are limitations in our countries for this type of research because of the high budget demand, especially due to infrastructure and care that traditional animal models require and which must meet specific ethical standards. Having an animal model of low cost and high versatility can encourage preclinical research, especially in the field of anesthesiology. The zebrafish is an emerging animal model with many characteristics that places it as an attractive alternative model for basic biomedical research: it has high fertility, quick development since the embryonic stage to adult and the cost of infrastructure, supplies and reagents needed for breeding and reproduction are low. This work is a narrative review and the aim is to present studies showing where fish were used for drug research and to develop protocols with anesthetics. In addition, the general characteristics of zebrafish and some basic research work in the field of anesthesiology in which the zebrafish has been used as a model are presented. This information can be useful for professionals and researchers interested in conducting basic biomedical research with zebrafish as a low cost animal model.

**Key words.** Zebrafish, anesthesiology, anesthetics, biomedical basic research, animal models

## Introducción

La investigación preclínica es fundamental en el campo de la salud pues permite identificar nuevas sustancias con potencial diagnóstico y/o terapéutico, reevaluar fármacos ya conocidos e identificar aspectos relacionados con la eficacia y la seguridad de múltiples sustancias y procedimientos. Los resultados de los ensayos preclínicos pueden ser extrapolados e implementados al campo clínico y constituyen la base de lo que se denomina medicina *traslacional* (1). Para realizar estudios preclínicos se emplean diversos modelos de investigación que incluyen desde *organelos subcelulares* como mitocondrias, vacuolas, vesículas, *sinaptosomas*, membranas biológicas; células y cultivos celulares; tejidos y órganos aislados diversos, hasta organismos vivos completos y en este caso, numerosos modelos animales han sido empleados tradicionalmente. En las últimas décadas y gracias al avance logrado en técnicas genéticas y de biología molecular se han desarrollado modelos animales, invertebrados y vertebrados, bastante refinados que reproducen un diverso y amplio número de enfermedades que afectan al ser humano: hipertensión arterial, obesidad, diabetes mellitus, epilepsia, enfermedades neurodegenerativas, arritmias entre muchas otras (2–6).

En el campo de la anestesiología la investigación básica no solo está orientada al descubrimiento y desarrollo de nuevas sustancias, también hay interés en desarrollar protocolos de inducción anestésica que puedan ser adaptados al campo clínico veterinario o humano. La investigación relacionada con protocolos de anestesia buscan establecer la secuencia ideal de pasos y los fármacos que garanticen una transición adecuada entre el estado de conciencia y el plano anestésico deseado: sedación, inmovilización, narcosis, amnesia, con el fin de ofrecer seguridad en procedimientos invasivos que requieran el uso de anestésicos y adicionalmente que permitan realizar procedimientos de eutanasia en animales (7–9).

Sin embargo, el uso regular de los modelos animales comunes como ratas, ratones, cobayos, etc., tienen muchas limitaciones especialmente en términos económicos, pues en muchas ocasiones se requieren instalaciones, equipos e insumos de

alto costo. Por esta razón continuamente hay una búsqueda de modelos animales vertebrados de bajo precio y el pez cebrá surge como un modelo animal de bajo costo y gran utilidad en la investigación biomédica básica (10–12).

El presente trabajo es una revisión narrativa que tiene como objetivo mostrar los aspectos generales del pez cebrá como modelo de investigación básica biomédica y presentar estudios en el campo de la anestesiología en donde este modelo ha sido empleado. La revisión realizada muestra que el uso de pez cebrá en investigación básica en el área de la anestesiología es limitado y constituye una herramienta de investigación con un amplio potencial.

## Revisión de la literatura

Para la presente revisión se realizó una búsqueda de la literatura existente desde 2005 hasta el presente en las bases de datos de *Medline*, *ScienceDirect*, *EMBASE* y el buscador Google académico. Las palabras claves para la búsqueda incluyeron peces, pez cebrá, anestésicos locales, anestésicos generales, anestesiología, que se combinaron con el conector lógico “and”. De igual forma se emplearon los términos rata y anestesiología o anestésicos, para contrastar el número de publicaciones en las que se emplea el modelo de rata con el modelo de pez cebrá (tabla 1). Se seleccionaron y revisaron tanto los artículos de revisión como los artículos originales más relacionados con el tema.

## Anestesia en peces

De todos los artículos citados en las bases de datos no todos están relacionados con el área de anestesiología o con investigación relacionada con anestésicos convencionales. De las publicaciones que tienen relación directa con el campo de la anestesiología, la mayoría tienen como fin evaluar eficacia y seguridad de fármaco en peces y/o protocolos de administración de medicamentos para anestesiarse peces en general y algunos al pez cebrá en particular. El uso de anestésico en peces es más común de lo que se piensa, pues en el área piscícola la producción de peces comerciales (*trucha arco iris*, *carpa*, *salmón*, *tilapia*) requiere evaluación

**Tabla 1. Niveles de Anestesia descritos en peces**

| Nivel | Estado clínico     | Movimiento              | Reflejos              | Equilibrio            | Tono muscular        | Respiración          |
|-------|--------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| 0     | Normal             | Nado activo             | Adecuado              | Normal                | Normal               | Normal               |
| 1.1   | Sedación leve      | Normal                  | Respuesta disminuida  | Normal                | Normal               | Normal               |
| 1.2   | Sedación profunda  | Disminución             | Leve respuesta        | Alteración leve       | Disminución leve     | Disminución leve     |
| 2.1   | Narcosis leve      | Con cambios de posición | Leve respuesta        | Pérdida de equilibrio | Disminución moderada | Puede aumentar       |
| 2.2   | Narcosis profunda  | Ausente                 | Estímulos vibratorios | Ausente               | Disminución moderada | Disminución moderada |
| 3.1   | Anestesia leve     | Ausente                 | Respuesta al dolor    | Ausente               | Disminución moderada | Disminución moderada |
| 3.2   | Anestesia profunda | Ausente                 | Analgesia             | Ausente               | Disminución moderada | Disminución moderada |
| 4     | Colapso medular    | Ausente                 | Ausente               | Ausente               | Ausente              | Disminuida (muerte)  |

La evaluación del nivel de anestesia se realiza evaluando parámetros de movimiento, reflejo, equilibrio, tono muscular y frecuencia respiratoria.

seguimiento clínico regular. Con frecuencia los peces son anestesiados para facilitar la manipulación de los ejemplares durante la toma de muestras de sangre, la toma de biopsias o la recolección de gametos para reproducción "in vitro" (8,13). El tema de la anestesia y sus características es importante en el área de investigación en peces, pues en muchas ocasiones procedimientos de diverso tipo requieren la inmovilización temporal del pez, sin que esto implique el riesgo de causar daño o muerte y se debe garantizar la total recuperación del animal (7,8).

ocurre externamente y el proceso de desarrollo desde la fertilización hasta la edad de adulto joven es rápido, pues se completa en alrededor de tres meses. Una ventaja adicional es que en las primeras etapas de vida, embrionaria y larval, el pez cebrilla es transparente, lo que permite hacer seguimiento directo del desarrollo y funcionamiento de órganos internos en condiciones normales, con técnicas de microscopía convencional, sin que se requiera sacrificar al animal o colocarlo en microambientes artificiales (10,14,15).

### **Pez cebrilla como modelo de investigación emergente.**

El pez cebrilla es un pez pequeño de agua dulce, pertenece a la familia *Cyprinidae*, es originario de ríos de la India y está distribuido en regiones de *Bangladesh, Nepal, Nyanmar y Pakistán*; sin embargo, es común hallarlo en acuarios de todo el mundo pues se ha popularizado como mascota. Esto implica que su adquisición es relativamente fácil y debido a que tiene una alta capacidad de reproducción, el riesgo de extinción es bajo, por lo tanto no es una especie protegida. Múltiples características han contribuido a la popularidad del pez cebrilla como modelo en investigación básica biomédica. Una de las características que hace a este modelo atractivo para investigación es que el desarrollo embrionario y larval

### **Reproducción y cuidado del pez cebrilla**

El pequeño tamaño del pez adulto (3 cm X 2 cm X 1 cm); garantiza el mantener numerosos ejemplares en un reducido espacio lo cual reduce los costos y el espacio de las instalaciones, así como los costos en la compra y mantenimiento de equipos. El pez cebrilla es una especie resistente a cambios medioambientales, sin embargo, su uso en investigación ha obligado a establecer condiciones básicas para su reproducción y mantenimiento. Para la crianza y reproducción se requieren de acuarios los cuales pueden ser de dos tipos: estáticos y de recirculación. Los sistemas estáticos constan de acuarios individuales con sistema de filtración, aireación y control de temperatura propios. Los sistemas de recirculación



tienen una unidad central que controla la temperatura, el pH y la aireación del agua, la cual circula continuamente a través de tanques conectados. Dado que el pez cebra es una especie altamente sociable se recomienda mantener 5 ejemplares por litro de agua. El agua debe tener condiciones específicas de pH (6.8 a 7.5), temperatura constante (23 a 30 °C) y se debe recambiar alrededor del 10 – 25% semanalmente. El lavado de acuarios y cambio de filtros se realiza cada mes. Adicionalmente se debe contar con un sistema de iluminación controlado que garantice ciclos de luz – oscuridad (14 horas-10 horas). En cuanto a la alimentación el pez cebra es omnívoro, pero se cuenta con preparaciones comerciales de alimentos granulados o en hojuelas que garantizan un aporte nutricional completo; la comida se administra diariamente una o dos veces al día y en etapas tempranas del desarrollo se recomienda administrar alimento vivo como *artemia* salina. La reproducción del pez cebra es continua, una hembra puede producir alrededor de 200 óvulos en cada puesta y el éxito de la fecundación es alto ya que se fecundan cerca del 90% de óvulos eclosionados. Sin embargo, óvulos y embriones se deben separar de los adultos, pues los peces devoran sus crías. Por lo general los reproductores, hembras y machos, deben estar separados y solo se colocan en un solo acuario cuando se tengan programada la reproducción; normalmente se colocan en acuarios de reproducción en una relación de 2 – 3 machos por una hembra (16–18). El costo de reproducción y mantenimiento de ejemplares e infraestructura también es bajo si se compara con los costos de bioterios especializados en roedores (19–21). La necesidad de manipulación de animales es mínima lo que reduce el requerimiento de personal técnico. También es importante considerar la facilidad para la administración de fármacos, especialmente los productos químicos hidrosolubles y el éxito que se tiene con la realización de estudios de *mutagénesis* a gran escala. De otro lado hay amplia documentación en cuanto a normas bioéticas que regulan su uso en laboratorio (16,17,22). También existen portales en internet que contienen bancos de información relacionada con recursos genéticos para estudio, bases de datos y diversos protocolos que incluyen métodos de crianza y diversas técnicas de investigación. Actualmente existen varias universidades, entre ellas la

Universidad de Oregón, que brindan la opción de adquirir ejemplares o poblaciones de peces cebra silvestre, así como líneas mutadas y transgénicas; de igual forma diversas instituciones ofrecen una amplia información genética de la especie (17,23–25) (Tabla 1).

En los últimos años se ha incrementado el número de publicaciones en investigación biomédica básica que emplean el pez cebra como modelo de estudio. Las áreas de investigación que cada vez usan con mayor frecuencia este modelo son numerosas e incluyen las áreas de genética (15,26), farmacología (27), toxicología (28), neurociencias (29), bioquímica (30), cardiología (31,32), cancerología (33,34), entre otras. Aunque el uso del pez cebra como modelo de investigación se ha incrementado en centros de investigación de USA y Europa, en Latinoamérica es relativamente desconocido y solo algunos centros de investigación en México, Chile, Argentina, Brasil, Uruguay y Colombia emplean este modelo (35).

#### **Evaluación del estado anestésico en peces**

Para la evaluación del estado anestésico de los peces se evalúan el movimiento espontáneo que se refleja en la velocidad y dirección de desplazamiento en el agua, así como la coordinación de los movimientos. También se evalúa la respuesta refleja a estímulos visuales y táctiles, el equilibrio, el tono muscular y la frecuencia respiratoria, que se evalúa por el movimiento el opérculo, aleta que cubre las branquias órganos que permiten el intercambio gaseoso en los peces. Con estos criterios se han descrito cuatronicos que van desde el estado de conciencia normal, sedación, narcosis, anestesia hasta el plano de colapso medular, niveles que se pueden alcanzar más o menos rápido dependiendo de aspectos como tipo de anestésico empleado, dosis, vía de administración entre otros (Tabla 2).

No solo la inducción de la anestesia en peces ha sido descrita en detalle, también la recuperación del animal es clave y por esta razón se han desarrollado escalas que permiten valorar el estado de anestesia del animal y realizar un seguimiento adecuado. La recuperación anestésica de los peces sigue un orden inverso al de la inducción de anestesia, va desde la

anestesia profunda hasta la recuperación total y se describen tres fases:

Estado I. Inmovilidad pero movimiento opercular

Estado II: movimientos corporales incoordinados y movimiento opercular

Estado III: Movimiento normal.

### **Tipos de anestesia empleada en peces**

La inducción de la anestesia en peces puede realizarse con medios físicos o con medios químicos. El tipo de anestésico elegido debe garantizar que el procedimiento y la anestesia no interfieran con los experimentos y su elección dependerá de aspectos relacionados con duración, profundidad del estado anestésico y toxicidad del anestésico seleccionado. En los casos en los que se busca la eutanasia del animal la toxicidad es un factor que se busca y el cual se evita en procedimientos normales. Sin embargo, cualquier anestésico seleccionado puede ser utilizado para procedimientos de eutanasia del animal experimental.

**Medios Físicos.** Los medios físicos más empleados son dos: la hipotermia y la corriente eléctrica.

**Crioanestesia.** El medio físico más empleado para inducir anestesia en peces es la hipotermia y existen trabajos en donde se evidencia como la inmersión del pez en agua a 4°C reduce la actividad motora (36,37). El efecto anestésico es moderado e incluye disminución del movimiento y disminución de la sensibilidad. No es claro el mecanismo de acción sin embargo en algunos estudios realizados en modelos in vitro se plantea que el efecto de la hipotermia estaría relacionado con actividad GABA y modulación de la señal de calcio en el sistema nervioso, lo cual permite plantear un posible efecto GABAérgico, un aumento de la actividad inhibitoria en diversos circuitos neurales que explicarían el posible efecto neuroprotector de la hipotermia en algunos casos (38,39). Sin embargo, se requieren más estudios para confirmar esta teoría. El método de la hipotermia para inducir anestesia en peces tiene limitaciones, en especial para realizar estudios relacionados con el sistema cardiovascular pues la exposición al frío tiene

un impacto directo sobre la regulación de la actividad de este sistema.

**Electroestimulación.** Es un método menos empleado y su uso es más frecuente en especies de gran tamaño como salmón y trucha arco iris entre otros donde es más fácil la aplicación de electrodos para realizar el procedimiento. Para inducir anestesia con corriente eléctrica se ha empleado tanta corriente directa, como corriente alterna. Se ha reportado que la corriente directa (12 V, 30 – 150 mA) produce *anodotaxis* (movimiento hacia el polo negativo de la fuente), electronarcosis y tetania; mientras que la corriente alterna (110 – 220 V) produce electronarcosis y tetania. Se debe tener en cuenta que la exposición prolongada puede causar daños a nivel de órganos y tejidos internos (40,41).

**Medios químicos.** Son los medios más empleados y en general se emplean fármacos anestésicos de uso veterinario y humano que pueden clasificarse como anestésicos locales y anestésicos generales, de igual forma se han empleado agentes hipnóticos y fármacos *vasoactivos* empleados en reanimación (tabla 3).

### **Métodos de administración de anestésicos en peces**

La administración de fármacos anestésicos en peces puede realizarse mediante dos métodos simples: en forma tópica o por métodos inyectables.

#### **Métodos tópicos.**

Es el método más convencional y simple pues básicamente consiste en diluir el anestésico en el agua; la sustancia al entrar en contacto con el pez ingresa al organismo por difusión. La velocidad de absorción del medicamento dependerá de las características del fármaco en términos de liposolubilidad, peso molecular, pKa, pH y temperatura del medio entre otras. Esta forma de administración de anestésicos de tipo químico equivale a los métodos de administración inhalatoria y tópica en especies terrestres, o en seres humanos, debido a que el anestésico entra en contacto directo con piel, mucosas y agallas. Una de las ventajas de este método es que la posibilidad de trauma es nulo, pero se debe vigilar que las características químicas del anestésico no modifiquen drásticamente el pH del

**Tabla 2: Anestesia en Peces**

| <b>Agentes anestésicos</b>          |  |                                |
|-------------------------------------|--|--------------------------------|
| <b>Tipo de anestesia</b>            | <b>Dosis</b>   | <b>Especie</b>                 |
| <b>Hipotermia</b>                   | Agua con hielo (4°C)                                 | Salmón, especies tropicales    |
| <b>Electroanalgesia</b>             | AC 120-220 V, DC 12 V; 30-150 mA                     | Varias especies                |
| <b>Agentes anestésicos químicos</b> |  |                                |
| <b>Fármaco</b>                      | <b>Dosis</b>   | <b>Especie</b>                 |
| <b>Tricaina (MS-222)</b>            | 25-480 mg/L  | Salmon, trucha, carpa tilapia  |
| <b>Lidocaína</b>                    | 100-350 mg/L   | Trucha pez cebra               |
| <b>Benzocaina</b>                   | 40-100 mg/L  | Salmon, trucha, carpa tilapia  |
| <b>Eugenol</b>                      | 6-150 mg/L   | Salmon, trucha, carpa tilapia  |
| <b>Halotano</b>                     | 0.5-20 ml/L  | Carpa                          |
| <b>Isoflurano</b>                   | 0.25-0.75 ml/L                                       | Carpa, pez cebra               |
| <b>Fenoxietanol</b>                 | 0.4-200 mg/L   | Trucha, salmón, carpa, tilapia |
| <b>Etomidato</b>                    | 1.7 mg/L   | Salmon, trucha, carpa tilapia  |
| <b>Quinaldina</b>                   | 15-70 mg/L   | Salmon, trucha, carpa tilapia  |
| <b>Ketamina</b>                     | 30-130 mg/K/(IM)                                     | Trucha, salmón, pez cebra      |
| <b>Propofol</b>                     | 2.5-7.5 mg/ml  | Varias especies                |
| <b>Alfaxolona</b>                   | 12 mg/k/(IM)   | Salmon, trucha                 |
| <b>Dioxido de carbono</b>           | 200-1500 mg/L (1:1 CO <sub>2</sub> -O <sub>2</sub> ) | Salmon, carpa                  |
| <b>Agentes anestésicos</b>          |  |                                |
| <b>Buprenorfina</b>                 | 0.01-0.1 mg/K/(IM)                                   | Trucha arco iris               |
| <b>Ketoprofeno</b>                  | 2 mg/k/(IM)  |                                |
| <b>Butorfanol</b>                   | 0.05-0.4 mg/k/(IM)                                   | Koi                            |
| <b>Carprofeno</b>                   | 1-5 mg/k(IM)   | Trucha arco iris               |
| <b>Lidocaína</b>                    | 0.1-2 mg/k/(IM)                                      | Trucha, pez cebra              |
| <b>Agentes ansiolíticos</b>         |  |                                |
| <b>Diazepam</b>                     | 1.5-5 mg/L   | Varias especies                |
| <b>Fluixetina</b>                   | 25-30 µg/L   | Varias especies                |
| <b>Buspirona</b>                    | 25-50 mg/L   | Varias especies                |
| <b>Clordiazepóxido</b>              | 5-20 mg/L  | Varias especies                |
| <b>Agentes vasoactivos</b>          |  |                                |
| <b>Doxapram</b>                     | 5 mg/k/ (IV-IP)                                      | Varias especies                |
| <b>Epinefrina</b>                   | 0.2-0.5 ml (IV-IP)                                   | Varias especies                |

**Nota:** Se observa los diferentes tipos de anestésicos físicos y químicos empleados así como algunos coadyuvantes de uso frecuente. Se incluyen dosis reportadas, tanto de especies comerciales como ornamentales o de investigación (12).



medio en el cual está el pez ya que cambios bruscos de pH (acidez o basicidad extremas) pueden comprometer la vida del ejemplar (8,9).

#### **Métodos Inyectables:**

Los anestésicos inyectables se pueden administrar en forma intramuscular, intraperitoneal e incluso intravascular. En este caso existe el riesgo de trauma visceral, hematomas y daño muscular (7,13,8).

#### **Anestesia en pez cebra.**

El pez cebra ha sido ampliamente empleado en estudios de biología del desarrollo de los diferentes órganos y sistemas del pez, que incluyen sistema nervioso, sistema cardiovascular, sistema renal, aparato gastrointestinal, sistema reproductor. Pero fue hace 2 décadas, a partir de los años 90, que son tomados como referencia para el estudio de enfermedades y su uso en investigación biomédica básica se intensifica, debido a que fue posible realizar mutaciones a larga escala empleando una sustancia química *mutagénica: la nitrosourea*. Esto, sumado a la identificación completa del genoma ha permitido realizar análisis de mutaciones y relacionarlo con funciones de genes, información que puede ser extrapolables al ser humano (42,43). Paralelo al uso del pez en investigación se han refinado las técnicas anestésicas con el fin de garantizar un manejo adecuado durante los experimentos y para disminuir la posibilidad de interacción con las intervenciones que se evalúan para evitar distorsiones en los resultados (7).

#### **Hipotermia en pez cebra**

Dentro de los agentes físicos empleados para anestesia en peces la hipotermia ha sido la más analizada en el pez cebra y se ha reportado que la combinación de hipotermia con otros anestésicos permite reducir la dosis de los fármacos lo que reduce su potencial toxicidad (36,37,7). Sin embargo se debe tener en cuenta que temperaturas inferiores a 10 °C reducen el metabolismo y la actividad de algunos órganos y sistemas, lo cual puede interferir con resultados de potenciales experimentos. Es de anotar que el uso de la hipotermia en el pez cebra está más orientado a desarrollar técnicas de criopreservación óptima en especial de células germinales (44–47).

#### **Agentes anestésicos en pez cebra**

**Tricaina.** De los fármacos anestésicos el más estudiado y que es muy empleado en peces es la *tricaina* conocida comercialmente como MS-222. En el caso del pez cebra la *tricaina* ha sido empleada para inducir desde sedación, anestesia, hasta eutanasia. Es una sustancia que actúa bloqueando principalmente canales de sodio, lo que afecta no solamente la actividad eléctrica neuronal, también afecta músculo esquelético y músculo cardiaco, de aquí se puede entender su potencial efecto *cardiotóxico*. Usualmente se emplea diluido en el medio a una concentración de 0,01-0,2 mg/ml a pH neutro, el tiempo de inicio del efecto sedante, anestésico y el tiempo de recuperación son rápidos y tiene un amplio margen de seguridad (7,48,49).

**Eugenol.** Otro de los anestésicos que se emplea comúnmente en peces y que tiene un amplio margen de seguridad es el eugenol, o aceite de clavo, que tradicionalmente ha sido empleado en odontología como anestésico local y antiséptico. Un estudio realizado mostró que el *eugenol* induce anestesia en pez cebra más rápidamente y con más bajas dosis comparado con *tricaina*, aunque los tiempos de recuperación fueron más prolongados. Sin embargo, los autores recomiendan el eugenol como un anestésico alternativo a la *tricaina*, dada la baja dosis requerida, el amplio margen de seguridad, la baja mortalidad y el bajo costo (50–52).

**Otros agentes anestésicos.** En otro estudio reciente *Collymore* y colaboradores evaluaron el efecto de lidocaína, *metomidato* e *isofluorano* comparado con hipotermia o MS-222 (53). El efecto sedante, anestésico, la recuperación y la mortalidad fue evaluado para cada uno de estos agentes. Se observó que el uso de MS-222 y lidocaína a bajas dosis (325 mg/L) son adecuados para realizar procedimientos invasivos, sin embargo lidocaína a altas dosis e *isofluorano* causaron alta mortalidad entre peces adultos, por lo que el uso exclusivo de estos agentes no se recomienda. Hipotermia y metomidato fueron útiles para realizar procedimientos rápidos que no causen dolor. Similares resultados han sido reportados en la literatura y además se sugiere que la combinación de anestésicos, *tricaina* e *isofluorano*,



disminuyen la dosis requerida y con ello la toxicidad potencial (49).

Otro agente analgésico y anestésico que ha sido estudiado en *zebrafish* es la *ketamina* en dosis subanestésicas, con el fin de evaluar el efecto sobre el comportamiento (Riehl et al, 2011). Se reporta que dosis de 20-40 mg/L reducen las manifestaciones de ansiedad en el pez y reduce los niveles de cortisol corporal total, sin embargo se requieren más estudios para evaluar su efecto a dosis anestésicas plenas (54–56).

#### Agentes ansiolíticos en pez cebra

El efecto de sedantes e hipnóticos como las benzodiacepinas también ha sido explorado pues el pez cebra emerge como un modelo para estudios de ansiedad. Se ha reportado que el *diazepam* agente agonista de receptores GABA-A produce efecto ansiolíticos a dosis no sedantes, 1,25-5 mg/L; mientras que *clordiazepoxido*, otro agonista GABA-A no mostró efecto ansiolítico a diferentes dosis. *Buspirona* un agente serotoninérgico también ha mostrado efectos ansiolíticos a dosis menores a las necesarias para producir anestesia, menos de 50 mg/L (57). De igual forma se ha reportado que *fluoxetina*, inhibidor de la recaptación de serotonina, también disminuye la ansiedad en pez cebra a dosis tan bajas que pueden ser típicas en aguas residuales donde la *fluoxetina* puede ser un contaminante más (58–60).

#### Otros agente farmacológicos

De los fármacos empleados en reanimación probablemente los más estudiados son agentes que afectan sistema nervioso autónomo, tanto agentes colinérgicos como *catecolaminérgicos*, debido a que el pez cebra es un modelo importante para estudios de desarrollo, función y trastornos del sistema cardiovascular. Por tanto existe gran número de publicaciones que muestran el efecto de algunas de estas sustancias en el desarrollo y la función del aparato cardiovascular (61–63).

En relación a estudios relacionados con relajantes musculares evaluados en el pez cebra son escasos los trabajos en donde se evalúan estas sustancias. *Lin* y colaboradores emplearon curare, algunos cationes divalentes y algunos aminoglicósidos, para evaluar la función del sistema sensorial del pez cebra denominado sistema de la línea lateral (64). El área

de los relajantes musculares es un campo donde el modelo de pez cebra puede ser muy útil para explorar seguridad y eficacia de este grupo de agentes.

#### Administración de anestésicos en pez cebra

Al igual que en otras especies de peces los medicamentos se pueden administrar diluidos en el agua cuando el fármaco es soluble para que el medicamento difunda por la piel, branquias o tracto digestivo, este método es ideal para administrar anestésicos en etapas de embrión y larva pues implica trauma mínimo; solamente se debe garantizar que el fármaco no modifique osmolaridad o pH, pues cambios bruscos pueden comprometer la vida de los ejemplares en estudio. Los métodos inyectables son muy utilizados en pez cebra adulto, también se puede utilizar en larvas y embriones sin embargo se requiere de microagujas que garanticen administrar un volumen adecuado con mínimo trauma.

#### Conclusiones

El pez cebra es un modelo animal que aparece como una alternativa para estudios de investigación biomédica básica, dado la alta fecundidad, el rápido desarrollo desde estadio embrionario hasta adulto y el bajo costo de insumos y reactivos necesarios para su crianza y reproducción. Ventajas adicionales del pez cebra incluyen el bajo costo en términos de infraestructura, tiempo y dinero que demanda, comparado con el uso de otras especies. Estas pueden ser ventajas importantes a considerar en países en desarrollo, como muchos de los países de Latinoamérica, en donde la inversión en ciencia, investigación y desarrollo es baja. A pesar de estas ventajas el pez cebra ha sido poco utilizado en el área de investigación básica en anestesiología, campo en el cual puede ser aprovechado para evaluar fármacos y plantear protocolos de anestesia extrapolables al campo clínico.

#### Financiación

Vicerrectoría de Investigaciones, Pontificia Universidad Javeriana, sede Bogotá. Proyecto: 5605, código presupuestal 120112Z0401200.





## Conflicto de intereses.

El autor declara no tener conflicto de intereses.

## Referencias

1. Becú-Villalobos D. Medicina traslacional, ¿moda o necesidad? *Med. B. Aires* 2014;**74**: 170–172.
2. Srinivasan K, Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian J. Med. Res.* 2007;**125**: 451.
3. West DB, York B. Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: lessons from animal models. *Am. J. Clin. Nutr.* 1998;**67**: 505S–512S.
4. McKinney WT, Jr, Bunney WE & Jr. Animal model of depression: I. review of evidence: implications for research. *Arch. Gen. Psychiatry* 1969;**21**: 240–248.
5. Smith G. Animal models of Alzheimer's disease: experimental cholinergic denervation. *Brain Res. Rev.* 1988;**13**: 103–118.
6. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater* 2007;**13**: 1–10.
7. Matthews M, Varga ZM. Anesthesia and euthanasia in zebrafish. *ILAR J. Natl. Res. Council. Inst. Lab. Anim. Resour.* 2012;**53**: 192–204.
8. Neiffer DL, Stamper MA. Fish sedation, anesthesia, analgesia, and euthanasia: considerations, methods, and types of drugs. *ILAR J.* 2009;**50**: 343–360.
9. Readman GD, Owen SF, Murrell JC, Knowles TG. Do Fish Perceive anaesthetics as aversive? *PLOS ONE* 2013;**8**: e73773.
10. Bakkers J. Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease. *Cardiovasc. Res.* 2011;**91**: 279–288.
11. Briggs JP. The zebrafish: a new model organism for integrative physiology. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2002;**282**: R3.
12. Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol. Sci.* 2005;**86**: 6.
13. Zahl IH, Samuelsen O, Kiessling A. Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. *Fish Physiol. Biochem.* 2011;**38**: 201–218.
14. Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat. Rev. Genet.* 2007;**8**: 353–367.
15. Ackermann GE, Paw BH. Zebrafish: a genetic model for vertebrate organogenesis and human disorders. *Front Biosci* 2003;**8**: d1227–d1253.
16. Koerber AS, Kalishman J. Preparing for a semiannual IACUC inspection of a satellite zebrafish (*Danio rerio*) facility. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 2009;**48**: 65–75.
17. Lawrence C. *et al.* Regulatory Compliance and the Zebrafish. *Zebrafish* 2009;**6**: 453–456.
18. Markovich ML, Rizzuto NV, Brown PB. Diet Affects Spawning in Zebrafish. *Zebrafish* 2007;**4**: 69–74.
19. Koerber AS, Kalishman J. Preparing for a Semiannual IACUC Inspection of a Satellite Zebrafish (*Danio rerio*) Facility. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. JAALAS* 2009;**48**: 65–75.
20. Kim S, Carlson R, Zafreen L, Rajpurohit SK, Jagadeeswaran P. Modular, Easy-to-Assemble, Low-Cost Zebrafish Facility. *Zebrafish* 2009;**6**: 269–274.
21. Lawrence C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture* 2007;**269**: 1–20.
22. Mrad de Osorio, A. Ética en la investigación con modelos animales experimentales. Alternativas y las 3 RS de Russel. Una responsabilidad y un compromiso ético que nos compete a todos. *Rev Colomb Bioét* 2006;**1**.
23. Sprague J, Doerry E, Douglas S, Westerfield M. The Zebrafish Information Network (ZFIN): a resource for genetic, genomic and developmental research. *Nucleic Acids Res.* 2001;**29**: 87–90.
24. Sprague J, *et al.* The Zebrafish Information Network (ZFIN): the zebrafish model organism database. *Nucleic Acids Res.* 2003;**31**: 241–243.
25. Smith SA. Zebrafish resources on the internet. *ILAR J.* 2012;**53**: 208–214.
26. Langenbacher, A. D. *et al.* Mutation in sodium-calcium exchanger 1 (NCX1) causes cardiac fibrillation in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005;**102**: 17699.
27. Rubinstein A L. Zebrafish: from disease modeling to drug discovery. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 2003;**6**: 218–223.
28. Rubinstein, A. L. Zebrafish assays for drug toxicity screening. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2006;**2**: 231–240.
29. Souza BR, Tropepe V. The role of dopaminergic signalling during larval zebrafish brain development: a tool for investigating the developmental basis of neuropsychiatric disorders. *Rev. Neurosci.* 2011;**22**: 107–119.

30. Taylor MR, Hurley JB, Van Epps, HA, Brockerhoff SE. A zebrafish model for pyruvate dehydrogenase deficiency: rescue of neurological dysfunction and embryonic lethality using a ketogenic diet. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004;**101**: 4584.
31. Nemtsas P, Wettwer E, Christ T, Weidinger G, Ravens U. Adult zebrafish heart as a model for human heart? An electrophysiological study. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2010;**48**: 161–171.
32. Milan DJ, Jones I L, Ellinor PT, MacRae CA. In vivo recording of adult zebrafish electrocardiogram and assessment of drug-induced QT prolongation. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 2006;**291**: H269.
33. Amatruda, J. F, Shepard, J. L., Stern, H. M. & Zon, L. I. Zebrafish as a cancer model system. *Cancer Cell* 2002;**1**: 229–231.
34. Moshal, K. S., Ferri-Lagneau, K. F. & Leung, T. Zebrafish model: worth considering in defining tumor angiogenesis. *Trends Cardiovasc. Med.* 2010;**20**: 114–119.
35. Allende, M. L., Calcaterra, N. B., Vianna, M. R. & Zolessi, F. R. First meeting of the Latin American zebrafish network. *Zebrafish* 2011;**8**: 31–33.
36. Chen, K. *et al.* The evaluation of rapid cooling as an anesthetic method for the zebrafish. *Zebrafish* 2014;**11**: 71–75.
37. Wilson J M, Bunte R M, Carty AJ. Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. JAALAS* 2009;**48**: 785–789.
38. Popovic R, Liniger R, Bickler PE. Anesthetics and mild hypothermia similarly prevent hippocampal neuron death in an in vitro model of cerebral ischemia. *Anesthesiology* 2000;**92**: 1343–1349.
39. Feiner JR. *et al.* Mild hypothermia, but not propofol, is neuroprotective in organotypic hippocampal cultures. *Anesth. Analg* 2005; **100**: 215–225.
40. Barham WT, Schoonbee H J, Visser JG. The use of electronarcosis as anaesthetic in the cichlid, *Oreochromis mossambicus* (Peters). I. General experimental procedures and the role of fish length on the narcotizing effects of electric currents. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 1987;**54**: 617–622.
41. Barham W T, Schoonbee H J, Visser JG. Some observations on the narcotizing ability of electric currents on the common carp *Cyprinus carpio*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 1989; **56**: 215–218.
42. Howe K. *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 2013;**496**: 498–503.
43. Barbazuk, W. B. *et al.* The Syntenic Relationship of the Zebrafish and Human Genomes. *Genome Res.* 2000; **10**: 1351–1358.
44. Guan M, Rawson, Zhang T. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes using improved controlled slow cooling protocols. *Cryobiology* 2008;**56**: 204–208.
45. Higaki S. *et al.* Cryopreservation of primordial germ cells by rapid cooling of whole zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *J. Reprod. Dev.* 2010; **56**: 212–218.
46. Bai, C. *et al.* Cooling rate optimization for zebrafish sperm cryopreservation using a cryomicroscope coupled with SYBR14/PI dual staining. *Cryobiology* 2013;**67**: 117–123.
47. Yang H, Carmichael C, Varga Z M, Tiersch TR. Development of a simplified and standardized protocol with potential for high-throughput for sperm cryopreservation in zebrafish *Danio rerio*. *Theriogenology* 2007;**68**: 128–136.
48. Attili S, Hughes SM. Anaesthetic Tricaine Acts Preferentially on Neural Voltage-Gated Sodium Channels and Fails to Block Directly Evoked Muscle Contraction. *PLOS ONE* 2014;**9**: e103751.
49. Huang WC. *et al.* Combined use of MS-222 (tricaine) and isoflurane extends anesthesia time and minimizes cardiac rhythm side effects in adult zebrafish. *Zebrafish* 2010;**7**: 297–304.
50. Grush J, Noakes DL, G, Moccia, R. D. The efficacy of clove oil as an anesthetic for the zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). *Zebrafish* 2004;**1**: 46–53.
51. Macova, S. *et al.* Comparison of acute toxicity of 2-phenoxyethanol and clove oil to juvenile and embryonic stages of *Danio rerio*. *Neuro Endocrinol. Lett.* 2008;**29**: 680–684.
52. Sánchez-Vázquez FJ, Terry MI, Felizardo VO, Vera LM. Daily rhythms of toxicity and effectiveness of anesthetics (MS222 and eugenol) in zebrafish (*Danio rerio*). *Chronobiol. Int.* 2011; **28**: 109–117.
53. Collymore C, Tolwani A, Lieggi, C, Rasmussen S. Efficacy and safety of 5 anesthetics in adult zebrafish (*Danio rerio*). *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. JAALAS* 2014;**53**: 198–203.
54. Riehl R. *et al.* Behavioral and physiological effects of acute ketamine exposure in adult

- zebrafish. *Neurotoxicol. Teratol.* 2011;**33**: 658–667.
55. Zakhary SM, *et al.* A behavioral and molecular analysis of ketamine in zebrafish. *Synapse* 2011;**65**: 160–167.
  56. Félix LM, Antunes LM, Coimbra AM. Ketamine NMDA receptor-independent toxicity during zebrafish (*Danio rerio*) embryonic development. *Neurotoxicol. Teratol.* 2014;**41**: 27–34.
  57. Bencan Z, Sledge D, Levin ED. Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2009;**94**: 75–80.
  58. Abreu M S. de *et al.* Diazepam and fluoxetine decrease the stress response in zebrafish. *PLoS One* 2014;**9**: e103232.
  59. Airhart MJ. *et al.* Movement disorders and neurochemical changes in zebrafish larvae after bath exposure to fluoxetine (PROZAC). *Neurotoxicol. Teratol.* 2007;**29**: 652–664.
  60. Abreu MS. de *et al.* Diazepam and Fluoxetine Decrease the Stress Response in Zebrafish. *PLOS ONE* 2014; **9**: e103232.
  61. Bakkens J. Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease. *Cardiovasc. Res.* 2011;**91**: 279–288.
  62. Brette F. *et al.* Characterization of isolated ventricular myocytes from adult zebrafish (*Danio rerio*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008;**374**: 143–146.
  63. Hu N, Sedmera D, Yost H J, Clark E B. Structure and function of the developing zebrafish heart. *Anat. Rec.* 2000;**260**: 148–157.
  64. Lin LY. *et al.* Extracellular Ca(2+) and Mg(2+) modulate aminoglycoside blockade of mechanotransducer channel-mediated Ca(2+) entry in zebrafish hair cells: an in vivo study with the SIET. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2013; **305**: C1060–1068.