

Estudos em Biociências e Biotecnologia:

Desafios, Avanços
e Possibilidades

Manuel Simões
(organizador)

VOL IV

 EDITORA
ARTEMIS
2024

Estudos em Biociências e Biotecnologia:

Desafios, Avanços
e Possibilidades

Manuel Simões
(organizador)

VOL IV

 EDITORA
ARTEMIS
2024



O conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons Atribuição-Não-Comercial NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0). Direitos para esta edição cedidos à Editora Artemis pelos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento, desde que sejam atribuídos créditos aos autores, e sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

A responsabilidade pelo conteúdo dos artigos e seus dados, em sua forma, correção e confiabilidade é exclusiva dos autores. A Editora Artemis, em seu compromisso de manter e aperfeiçoar a qualidade e confiabilidade dos trabalhos que publica, conduz a avaliação cega pelos pares de todos manuscritos publicados, com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

Editora Chefe	Prof. ^a Dr. ^a Antonella Carvalho de Oliveira
Editora Executiva	M. ^a Viviane Carvalho Mocellin
Direção de Arte	M. ^a Bruna Bejarano
Diagramação	Elisangela Abreu
Organizador	Prof. Dr. Manuel Simões
Imagem da Capa	Vivilweb/123RF
Bibliotecário	Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

Conselho Editorial

Prof.^a Dr.^a Ada Esther Portero Ricol, *Universidad Tecnológica de La Habana “José Antonio Echeverría”*, Cuba
Prof. Dr. Adalberto de Paula Paranhos, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil
Prof. Dr. Agustín Olmos Cruz, *Universidad Autónoma del Estado de México*, México
Prof.^a Dr.^a Amanda Ramalho de Freitas Brito, Universidade Federal da Paraíba, Brasil
Prof.^a Dr.^a Ana Clara Monteverde, *Universidad de Buenos Aires*, Argentina
Prof.^a Dr.^a Ana Júlia Viamonte, Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP), Portugal
Prof. Dr. Ángel Mujica Sánchez, *Universidad Nacional del Altiplano*, Peru
Prof.^a Dr.^a Angela Ester Mallmann Centenaro, Universidade do Estado de Mato Grosso, Brasil
Prof.^a Dr.^a Begoña Blandón González, *Universidad de Sevilla*, Espanha
Prof.^a Dr.^a Carmen Pimentel, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil
Prof.^a Dr.^a Catarina Castro, Universidade Nova de Lisboa, Portugal
Prof.^a Dr.^a Cirila Cervera Delgado, *Universidad de Guanajuato*, México
Prof.^a Dr.^a Cláudia Neves, Universidade Aberta de Portugal
Prof.^a Dr.^a Cláudia Padovesi Fonseca, Universidade de Brasília-DF, Brasil
Prof. Dr. Cleberton Correia Santos, Universidade Federal da Grande Dourados, Brasil
Prof. Dr. David García-Martul, *Universidad Rey Juan Carlos de Madrid*, Espanha
Prof.^a Dr.^a Deuzimar Costa Serra, Universidade Estadual do Maranhão, Brasil
Prof.^a Dr.^a Dina Maria Martins Ferreira, Universidade Estadual do Ceará, Brasil
Prof.^a Dr.^a Edith Luévano-Hipólito, *Universidad Autónoma de Nuevo León*, México
Prof.^a Dr.^a Eduarda Maria Rocha Teles de Castro Coelho, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal
Prof. Dr. Eduardo Eugênio Spers, Universidade de São Paulo (USP), Brasil
Prof. Dr. Eloi Martins Senhoras, Universidade Federal de Roraima, Brasil
Prof.^a Dr.^a Elvira Laura Hernández Carballido, *Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo*, México



Prof.ª Dr.ª Emilas Darlene Carmen Lebus, *Universidad Nacional del Nordeste/ Universidad Tecnológica Nacional, Argentina*
Prof.ª Dr.ª Erla Mariela Morales Morgado, *Universidad de Salamanca, Espanha*
Prof. Dr. Ernesto Cristina, *Universidad de la República, Uruguay*
Prof. Dr. Ernesto Ramírez-Briones, *Universidad de Guadalajara, México*
Prof. Dr. Fernando Hitt, *Université du Québec à Montréal, Canadá*
Prof. Dr. Gabriel Díaz Cobos, *Universitat de Barcelona, Espanha*
Prof.ª Dr.ª Gabriela Gonçalves, Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP), Portugal
Prof. Dr. Geoffroy Roger Pointer Malpass, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Brasil
Prof.ª Dr.ª Gladys Esther Leoz, *Universidad Nacional de San Luis, Argentina*
Prof.ª Dr.ª Glória Beatriz Álvarez, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*
Prof. Dr. Gonçalo Poeta Fernandes, Instituto Politécnico da Guarda, Portugal
Prof. Dr. Gustavo Adolfo Juarez, *Universidad Nacional de Catamarca, Argentina*
Prof. Dr. Guillermo Julián González-Pérez, *Universidad de Guadalajara, México*
Prof. Dr. Håkan Karlsson, *University of Gothenburg, Suécia*
Prof.ª Dr.ª Iara Lúcia Tescarollo Dias, Universidade São Francisco, Brasil
Prof.ª Dr.ª Isabel del Rosario Chiyon Carrasco, *Universidad de Piura, Peru*
Prof.ª Dr.ª Isabel Yohena, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*
Prof. Dr. Ivan Amaro, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil
Prof. Dr. Iván Ramon Sánchez Soto, *Universidad del Bío-Bío, Chile*
Prof.ª Dr.ª Ivânia Maria Carneiro Vieira, Universidade Federal do Amazonas, Brasil
Prof. Me. Javier Antonio Albornoz, *University of Miami and Miami Dade College, Estados Unidos*
Prof. Dr. Jesús Montero Martínez, *Universidad de Castilla - La Mancha, Espanha*
Prof. Dr. João Manuel Pereira Ramalho Serrano, Universidade de Évora, Portugal
Prof. Dr. Joaquim Júlio Almeida Júnior, UniFIMES - Centro Universitário de Mineiros, Brasil
Prof. Dr. Jorge Ernesto Bartolucci, *Universidad Nacional Autónoma de México, México*
Prof. Dr. José Cortez Godinez, Universidad Autónoma de Baja California, México
Prof. Dr. Juan Carlos Cancino Diaz, Instituto Politécnico Nacional, México
Prof. Dr. Juan Carlos Mosquera Feijoo, *Universidad Politécnica de Madrid, Espanha*
Prof. Dr. Juan Diego Parra Valencia, *Instituto Tecnológico Metropolitano de Medellín, Colômbia*
Prof. Dr. Juan Manuel Sánchez-Yañez, *Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México*
Prof. Dr. Juan Porras Pulido, *Universidad Nacional Autónoma de México, México*
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil
Prof. Dr. Leinig Antonio Perazolli, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Brasil
Prof.ª Dr.ª Livia do Carmo, Universidade Federal de Goiás, Brasil
Prof.ª Dr.ª Luciane Spanhol Bordignon, Universidade de Passo Fundo, Brasil
Prof. Dr. Luis Fernando González Beltrán, *Universidad Nacional Autónoma de México, México*
Prof. Dr. Luis Vicente Amador Muñoz, *Universidad Pablo de Olavide, Espanha*
Prof.ª Dr.ª Macarena Esteban Ibáñez, *Universidad Pablo de Olavide, Espanha*
Prof. Dr. Manuel Ramiro Rodriguez, *Universidad Santiago de Compostela, Espanha*
Prof. Dr. Manuel Simões, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Portugal
Prof.ª Dr.ª Márcia de Souza Luz Freitas, Universidade Federal de Itajubá, Brasil
Prof. Dr. Marcos Augusto de Lima Nobre, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Brasil
Prof. Dr. Marcos Vinicius Meiado, Universidade Federal de Sergipe, Brasil
Prof.ª Dr.ª Mar Garrido Román, *Universidad de Granada, Espanha*
Prof.ª Dr.ª Margarida Márcia Fernandes Lima, Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil
Prof.ª Dr.ª María Alejandra Arecco, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*
Prof.ª Dr.ª Maria Aparecida José de Oliveira, Universidade Federal da Bahia, Brasil
Prof.ª Dr.ª Maria Carmen Pastor, *Universitat Jaume I, Espanha*



Prof.ª Dr.ª Maria da Luz Vale Dias – Universidade de Coimbra, Portugal
Prof.ª Dr.ª Maria do Céu Caetano, Universidade Nova de Lisboa, Portugal
Prof.ª Dr.ª Maria do Socorro Saraiva Pinheiro, Universidade Federal do Maranhão, Brasil
Prof.ª Dr.ª MªGraça Pereira, Universidade do Minho, Portugal
Prof.ª Dr.ª Maria Gracinda Carvalho Teixeira, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil
Prof.ª Dr.ª María Guadalupe Vega-López, *Universidad de Guadalajara, México*
Prof.ª Dr.ª Maria Lúcia Pato, Instituto Politécnico de Viseu, Portugal
Prof.ª Dr.ª Maritza González Moreno, *Universidad Tecnológica de La Habana, Cuba*
Prof.ª Dr.ª Mauriceia Silva de Paula Vieira, Universidade Federal de Lavras, Brasil
Prof. Dr. Melchor Gómez Pérez, *Universidad del Pais Vasco, Espanha*
Prof.ª Dr.ª Ninfa María Rosas-García, Centro de Biotecnología Genómica-Instituto Politécnico Nacional, México
Prof.ª Dr.ª Odara Horta Boscolo, Universidade Federal Fluminense, Brasil
Prof. Dr. Osbaldo Turpo-Gebera, *Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Peru*
Prof.ª Dr.ª Patrícia Vasconcelos Almeida, Universidade Federal de Lavras, Brasil
Prof.ª Dr.ª Paula Arcoverde Cavalcanti, Universidade do Estado da Bahia, Brasil
Prof. Dr. Rodrigo Marques de Almeida Guerra, Universidade Federal do Pará, Brasil
Prof. Dr. Saulo Cerqueira de Aguiar Soares, Universidade Federal do Piauí, Brasil
Prof. Dr. Sérgio Bitencourt Araújo Barros, Universidade Federal do Piauí, Brasil
Prof. Dr. Sérgio Luiz do Amaral Moretti, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil
Prof.ª Dr.ª Silvia Inés del Valle Navarro, *Universidad Nacional de Catamarca, Argentina*
Prof.ª Dr.ª Solange Kazumi Sakata, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN)- USP, Brasil
Prof.ª Dr.ª Stanislava Kashtanova, *Saint Petersburg State University, Russia*
Prof.ª Dr.ª Susana Álvarez Otero – *Universidad de Oviedo, Espanha*
Prof.ª Dr.ª Teresa Cardoso, Universidade Aberta de Portugal
Prof.ª Dr.ª Teresa Monteiro Seixas, Universidade do Porto, Portugal
Prof. Dr. Valter Machado da Fonseca, Universidade Federal de Viçosa, Brasil
Prof.ª Dr.ª Vanessa Bordin Viera, Universidade Federal de Campina Grande, Brasil
Prof.ª Dr.ª Vera Lúcia Vasilévski dos Santos Araújo, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Brasil
Prof. Dr. Wilson Noé Garcés Aguilar, *Corporación Universitaria Autónoma del Cauca, Colômbia*
Prof. Dr. Xosé Somoza Medina, *Universidad de León, Espanha*

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)

E82 Estudos em biociências e biotecnologia [livro eletrônico] : desafios, avanços e possibilidades IV/ Organizador Manuel Simões. – Curitiba, PR: Artemis, 2024.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

Edição bilingue

ISBN 978-65-81701-33-8

DOI 10.37572/EdArt_311024338

1. Ciências biológicas. 2. Biotecnologia. 3. Biomedicina.
I. Simões, Manuel.

CDD 574

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422



PREFÁCIO

O volume IV da edição “Estudos em Biociências e Biotecnologia: Desafios, Avanços e Possibilidades” disponibiliza ao leitor informação científica avançada de caráter fundamentalmente aplicado. O livro está organizado em sete capítulos que focam essencialmente em conhecimento avançado em ciências biomédicas, neurociências, parasitologia, saúde animal e em processos avançados e sustentáveis de produção alimentar.

Manuel Simões

<https://orcid.org/0000-0002-3355-4398>

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1..... 1

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE QUERCETINA ENZIMÁTICAMENTE MODIFICADA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE CÉRVIX Y DE COLON

David Alejandro Macías Martín

Iliana del Carmen Barrera Martínez

Flor Yohana Flores Hernández

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3110243381

CAPÍTULO 2..... 13

DEVELOPMENTAL HETEROCHRONY AND ITS RELATIONSHIP WITH THE CELLULAR SENESCENCE: A NEW PERSPECTIVE ON THE ETIOLOGY OF NEURODEGENERATION

Ana Karen Ramírez- Reyes

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3110243382

CAPÍTULO 3..... 22

DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA NECROSIS RENAL Y DEL BAZO (ISKNV) DEL PEZ CEBRA EN COLONIAS DE EXPERIMENTACIÓN DE ARGENTINA

Juan Martín Laborde

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3110243383

CAPÍTULO 4..... 36

PRESENCIA DE *ANAPLASMA MARGINALE* Y *BABESIA SPP.* EN *HAEMATOBIA IRRITANS* COLECTADAS EN NUEVO LEÓN

José Pablo Villarreal Villarreal

Pilar Elizabeth Rincón González

Jesús Jaime Hernández Escareño

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3110243384

CAPÍTULO 5..... 45

EVALUACIÓN DE LÍNEAS ÉLITE DE MAÍZ AZUL PARA VALLES ALTOS DE MÉXICO

José Luis Arellano-Vázquez

Germán Fernando Gutiérrez-Hernández

Luis Fernando Ceja-Torres
Martín Filiberto García Mendoza
Estela Flores-Gómez
Patricia Vázquez-Lozano
Donají Ariadna Ramírez López

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3110243385

CAPÍTULO 6..... 54

EFFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE PROTEÍNAS DE *SPHENARIUM PURPURASCENS* EXTRAÍDAS CON ULTRASONIDO EN SALCHICHAS TIPO VIENA

Salvador Osvaldo Cruz-López
Yenizey Merit Alvarez-Cisneros

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3110243386

CAPÍTULO 7 68

PRODUCCIÓN ARTESANAL DE PILONCILLO CON ENFOQUE SOSTENIBLE

Luisiana Fabiola Palomo González
José Antonio de los Reyes
Marco A. Sánchez Castillo

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3110243387

SOBRE O ORGANIZADOR 118

ÍNDICE REMISSIVO 119

CAPÍTULO 3

DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA NECROSIS RENAL Y DEL BAZO (ISKNV) DEL PEZ CEBRA EN COLONIAS DE EXPERIMENTACIÓN DE ARGENTINA

Data de submissão: 01/10/2024

Data de aceite: 14/10/2024

Juan Martín Laborde

Laboratorio de Animales de
Experimentación (LAE)

Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de La Plata (UNLP)
La Plata, Buenos Aires, Argentina

RESUMEN: El pez cebra (*Danio rerio*) actualmente es considerado como modelo animal en ensayos de desarrollo embrionario, análisis de la función genética y mutagénesis. Sus características fisiológicas, tales como la alta fecundidad, fertilización externa y mecanismos moleculares del desarrollo del embrión similares a todos los vertebrados, permitieron que el pez cebra se haya convertido gradualmente en el modelo vertebrado inferior más utilizado luego del ratón. El virus de la necrosis renal y del bazo en el pez cebra (ISKNV) pertenece a la familia *Iridoviridae*. Este virus tiene un rango de hospedadores extremadamente amplio y causa infecciones naturales en el pez cebra produciendo enfermedad clínica, aunque

se desconoce la mortalidad. Los signos clínicos se caracterizan por letargo, pérdida de apetito, natación anormal, distensión de la cavidad celómica y, en los casos más graves, dificultad respiratoria, branquias pálidas y hemorragias petequiales en la base de las aletas. El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de ISKNV en bioerios de peces cebra de nuestro país. Se analizaron 50 peces cebra adultos (1 año de edad) provenientes de 5 bioerios (10 peces de cada uno). Se tomaron muestras de tejido visceral de cada animal que fueron procesadas con un equipo comercial para extracción de ADN. Para la detección viral se utilizó una técnica de PCR directa utilizando cebadores específicos que amplifican un fragmento de 562 pb basado en la secuencia del gen principal de la proteína de la cápside (MCP). Resultaron positivas las muestras de 7 animales de uno de los bioerios estudiados. Se concluyó que la investigación por PCR resultó útil para detectar por primera vez en Argentina el ISKNV. Estos resultados indican que, debido al riesgo de infección de colonias de peces cebra, es necesario implementar técnicas sensibles, como la PCR descripta, e implementar estrictas prácticas de bioseguridad, ya que estas infecciones pueden tener un gran impacto en los peces de laboratorio e invalidar los datos experimentales en este modelo animal.

PALABRAS CLAVE: Iridovirus. Pez cebra. PCR.

1 INTRODUCCIÓN

El pez cebra, *Brachydanio rerio* (también conocido como *Danio rerio*) es utilizado como modelo de desarrollo embrionario de vertebrados, análisis de la función génica, y mutagénesis. Previo al desarrollo del modelo del pez cebra en la década de 1970, genetistas del desarrollo experimentaban con modelos de invertebrados como *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y, más recientemente, con *Caenorhabditis elegans* (nematodo) para la investigación del desarrollo embrionario temprano (Kahn, 1994).

Por su alta fecundidad y fertilización externa, el pez cebra poseía los atributos de estos modelos existentes, sin sus inconvenientes inherentes. Debido a que los mecanismos moleculares fundamentales del desarrollo de un embrión son similares para todos los vertebrados, permitió que el pez cebra, se haya convertido gradualmente en el modelo vertebrado inferior de elección. Los procesos de mutagénesis han permitido experimentar en áreas del genoma sin conocimiento previo de la función de genes específicos. Desde hace algunos años en los laboratorios, se utilizan ratones y ratas en técnicas donde se eliminan mutaciones de interés de genes conocidos para estudiar el efecto del gen en el fenotipo resultante. A través de la creación de fenotipos mutantes por medio de la mutagénesis química, las funciones de muchos genes asociados a la pigmentación, tejido muscular, cardiovascular y el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) han sido investigados extensivamente (Driever *et al.*, 1994; Postlethwait *et al.*, 1997). A principios de la década de 1970, George Streisinger (Universidad de Oregon), un genetista de fagos, identificó al pez cebra como un modelo de vertebrado. Para aislar mutaciones genéticas en pez cebra utilizó protocolos de mutagénesis. Esta línea sistemática de trabajo ha continuado en la Universidad de Oregón por varios laboratorios, que han aportado gran parte de la información, involucrando el desarrollo embrionario temprano del pez cebra. A comienzo de la década de 1990, dos laboratorios (Christiane Nusslein-Volhard del Instituto Max Planck para el Desarrollo Biología y Wolfgang Driever del Hospital General de Massachusetts), comenzaron a utilizar una metodología llamada “mutagénesis de saturación” para identificar fenotipos mutantes en el pez cebra (Kahn, 1994). En 1996, esta metodología había producido más de 2000 mutaciones en varios cientos de genes que son necesarios para el desarrollo embrionario normal (Driever *et al.*, 1996; Haffter *et al.*, 1996). En 1994, John Postlethwait. (Universidad de Oregón) publicó el primer mapa genético donde se identificaron aproximadamente 400 marcadores genéticos. Por 1996, el mapa genético del pez cebra ya había crecido para incorporar aproximadamente 1200 marcadores (Postlethwait *et al.*, 1997). El pez cebra se ha utilizado como modelo experimental en varios campos de la investigación biomédica (Streisinger

et al., 1981), pero solo recientemente se utiliza principalmente como modelo en biología del desarrollo. Sin embargo, los procesos biológicos relevantes para un organismo adulto también se pueden abordar (por ejemplo, homeostasia) Jagadeeswaran & Liu, 1997. Las principales investigaciones utilizando el pez cebra se han realizado en desarrollo temprano y organogénesis, pero también en una amplia variedad de ensayos biológicos (Dietrich, 1999a, 1999b; Rubinstein, 2003; Weinstein *et al.*, 1995).

La utilidad del pez cebra como sistema modelo no depende solo en sus rasgos compartidos con otros animales y humanos, sino también en varias características que permiten una variedad de experiencias y enfoques. El pez cebra adulto es pequeño (aproximadamente 3-4 cm de largo), lo que hace posible mantener un número mayor de peces que de otros vertebrados, como pollos o ratones, en un determinado espacio. Además, el pez cebra requiere poco mantenimiento, a excepción de cambios de agua y alimentación pero estos pueden ser automatizados para facilitar la tarea. Esto hace del mismo una opción muy económica como organismo modelo. La hembra del pez cebra pone habitualmente un par de cientos de huevos, y es posible volver a cruzar los progenitores a intervalos semanales. Los grandes tamaños de las camadas son importantes para los experimentos genéticos y también al proporcionar un gran número de embriones para ensayos moleculares y bioquímicos como una población bien sincronizada en su rápido desarrollo ontogenético de solo tres días hasta llegar al estadio de alevino. Los embriones o alevinos de pez cebra se desarrollan fuera de la madre y poseen una yema que los nutre durante varios días. Esto significa que todas las etapas de desarrollo son accesibles para la experiencia, sin sacrificar a la madre, como a menudo se necesita en otras especies de vertebrados para obtener embriones que se desarrollan en el útero. Los embriones son ópticamente transparentes, que permite observar células en el embrión vivo. Los embriones de pez cebra se desarrollan muy rápidamente, y 24 horas después de la fertilización los embriones tienen una apariencia de pez con la mayoría de los sistemas de órganos ya desarrollados y funcionando. Entonces aquellos experimentos que involucran el desarrollo de un sistema orgánico específico (por ejemplo, expresión transitoria de un gen particular) es posible obtener resultados en uno o dos días a partir del inicio de desarrollo del embrión. El genoma del pez cebra es aproximadamente la mitad del tamaño del que posee un mamífero, así la generación de mapas físicos y posicionales para proyectos de clonación en el pez cebra requieren esfuerzos similares a los de un ratón. El pez cebra alcanza la madurez sexual en un tiempo relativamente corto (2-4 meses, dependiendo de la densidad de peces y la tasa de alimentación). En conjunto, estas características permiten la utilización del pez

cebra para realizar investigaciones en una variedad métodos y de factores embrionarios, moleculares y genéticos (Dietrich, 1999a, 1999b).

1.1 PROGRAMA DE CONTROL DE SALUD EN PECES CEBRA

Un programa de control de salud debe minimizar o eliminar el impacto de las enfermedades infecciosas en la salud animal y los resultados de la investigación, así como proteger la salud humana. Hay muchos factores a considerar cuando se diseña un programa de control de salud: tamaño y diversidad del programa de investigación, frecuencia de importación, tipo de alojamiento (diseño de las instalaciones) y manejo, uso de alimentos vivos frente a comerciales, agentes a controlar, metodologías de prueba para ser utilizado, frecuencia y costos financieros. Los programas de control de la salud bien diseñados realizarán un seguimiento de la salud de una colonia de pez cebra a lo largo del tiempo, así como también ayudarán en la identificación de los problemas de bioseguridad y cría a medida que sean visibles. La exclusión de patógenos de las colonias de pez cebra es la herramienta más poderosa para proteger la salud del pez cebra. Sin embargo, cuando se producen interrupciones en la bioseguridad, la detección de patógenos lo antes posible permite una evaluación rápida de los riesgos para la salud animal y los programas de investigación, así como una rápida acción para la biocontención (Astrofsky *et al.*, 2002).

Los programas de control de la salud de las colonias deben reflejar las necesidades de la investigación que se realiza en la institución y mostrar flexibilidad para adaptarse a las necesidades cambiantes. Por ejemplo, las investigaciones que utilicen modelos de animales inmunocomprometidos o que realicen estudios de toxicología deben excluir tantos agentes patógenos como sea posible, mientras que los patógenos oportunistas pueden considerarse aceptables para otros objetivos de investigación. Cada instalación o programa debe determinar la frecuencia de las pruebas y la lista particular de agentes de interés y debe revisar su programa de control de salud a medida que haya nueva información disponible. En general, los agentes, que pueden tener un impacto significativo en el programa de investigación, deben someterse a pruebas con más frecuencia. Los agentes que presentan menos riesgo para el programa debido a la baja prevalencia o baja patogenicidad se pueden controlar con menor frecuencia. La pérdida inesperada de peces valiosos utilizados como modelo animal en investigación debido a enfermedades, es una de las causas más frecuentes de fracasos en la investigación. Si estas pérdidas ocurren debido a una mortalidad lenta e insidiosa o por una repentina epizootia o una falla en el sistema de soporte vital, influyen en forma

negativa en la validez de los resultados, con datos estadísticos confusos y pérdida de horas de trabajo en investigación. En la actualidad existen programas de control sanitario adaptados al pez cebra que permiten una estandarización sanitaria similar a la que se desarrolla en instalaciones de roedores de experimentación. La infección es siempre el resultado de una interacción compleja del huésped, medioambiente y patógeno. Los tres factores pueden estar fuera de balance en un ambiente artificial de las instalaciones de peces de laboratorio. Uno de los objetivos principales del manejo de peces de experimentación es mantener el sistema acuático en un estado equilibrado donde el huésped y los patógenos potenciales coexisten en un entorno de laboratorio controlado. Debido a que los sistemas acuáticos son ecosistemas muy complejos, las relaciones patógeno-huésped son difíciles de acceder en el ambiente artificial de laboratorio. En consecuencia, controlar los brotes de las enfermedades puede ser una tarea difícil. En principio, los patógenos primarios pueden inducir enfermedades cuando otros factores ambientales están en equilibrio y deben distinguirse de los patógenos secundarios u oportunistas que causan enfermedades cuando otros metabólicos o factores ambientales no son óptimos. La salud deficiente en los animales es a menudo una conjunción de una o más variables ambientales marginales tales como la temperatura, pH, dureza / alcalinidad u otro elemento químico inadecuado, nutrición, exceso de bioincrustaciones o sobrecrecimiento bacteriano. La enfermedad en el medio acuático por lo general, se produce cuando los factores en un ambiente marginal encuentran el equilibrio a favor del patógeno (Kent *et al.*, 2009).

El diagnóstico de la enfermedad puede observarse como el reconocimiento del desequilibrio dentro del sistema. La prevención actúa como un amortiguador para extender los límites del sistema equilibrado. El objetivo de un tratamiento sanitario es restaurar equilibrio a un sistema interrumpido. La gestión adecuada de la salud y el control de las enfermedades dependen de la implementación efectiva de las prácticas de laboratorio como medicina preventiva, diagnóstico y tratamiento (Kent *et al.*, 2009).

Al evaluar la salud de una colonia, es importante evaluar además el comportamiento de los animales a diario y realizar evaluaciones diagnósticas de mortalidades inexplicables así como los diagnósticos rutinarios en los animales centinela (Astrofsky, 2002). Varios signos inespecíficos en apariencia anormal o de comportamiento pueden ser útiles en el diagnóstico inicial para ayudar a determinar el agente o evento causal. Es importante recordar que estos son signos clínicos inespecíficos de alguna posible enfermedad y son útiles solo para formar una lista inicial de diagnósticos diferenciales. Por lo tanto se deben implementar pruebas de diagnóstico más específicas para identificar con precisión el

agente causal respecto a la identificación de signos clínicos, diagnósticos y tratamientos disponibles para la instalación (Astrofsky, 2000; Matthews, 2001).

Aunque el pez cebra se ha convertido en un modelo de investigación importante, se sabe relativamente poco acerca de las enfermedades que afectan a esta especie cuando se mantienen en cautiverio. Muchas de los agentes que causan estas enfermedades pueden detectarse en los animales o en muestras del medio ambiente que habitan. De hecho, los problemas de salud en las colonias de investigación del pez cebra podrían poner en grave peligro muchos recursos económicos en investigación, y las instalaciones de algunos investigadores han experimentado mortalidades devastadoras y graves en sus colonias de pez cebra. Además, las infecciones persistentes, pero menos graves, han contaminado varias instalaciones. Al igual que con otros animales de laboratorio utilizados en la investigación, es imperativo realizar estudios con un pez cebra libre de enfermedades (Kent *et al.*, 2009). A diferencia de los modelos de roedores, donde hay muchas cepas certificadas libres de patógenos específicos (SPF), se ha comenzado a producir poblaciones de pez cebra de SPF acorde con una lista de agentes patógenos de los cuales deben estar ausentes en dichos animales y que deben ir acompañadas de pruebas de diagnóstico sensibles para los patógenos graves (Collymore *et al.*, 2016).

Muchos de los agentes que afectan al pez cebra y que pueden alterar los resultados en las investigaciones son patógenos primarios y / u oportunistas y que pueden causar infecciones subclínicas pero que en condiciones de estrés, técnicas de manejo deficiente y la mala calidad del agua pueden desarrollar enfermedad. Los signos de infección pueden incluir una ligera disminución en la eficiencia reproductiva, una reducción en el apetito o el crecimiento y / o un aumento en la mortalidad en las colonias. Los peces utilizados en experimentación con un status sanitario desconocido pueden ser un riesgo potencial para la salud de las personas que los utilizan y dar resultados experimentales erróneos, dificultades para la reproducibilidad de la experiencia y la utilización innecesaria de más animales para demostrar significación estadística. Por lo tanto es necesario aplicar medidas para mitigar ese riesgo y asegurar que los resultados de la investigación realizada estén libres de variables no controladas (Kent *et al.*, 2009).

1.2 INFECCIONES POR VIRUS DE LA NECROSIS INFECCIOSA DEL BAZO Y EL RIÑÓN

Aunque no se han reportado casos de infecciones virales de ocurrencia natural en instalaciones de investigación de pez cebra, tales infecciones probablemente ocurren, considerando lo que se sabe sobre otros peces mantenidos en cautiverio. Si ocurren infecciones virales, pueden afectar seriamente muchos tipos de investigación. La tarea de

identificar y caracterizar infecciones virales de ocurrencia natural en pez cebra es, por lo tanto, de importancia crítica. El costo potencial de infecciones virales no diagnosticadas puede estar aumentando a medida que la naturaleza de la investigación del pez cebra cambia y a medida que las instalaciones del pez cebra se vuelven más centralizadas. Aunque algunas infecciones virales en cualquier especie huésped pueden producir eventos epizooticos, alta mortalidad o signos clínicos notables, muchas infecciones virales causan solo infecciones subclínicas o de bajo grado. Además, los efectos negativos de las infecciones subclínicas en la investigación rara vez se informan. Incluso las infecciones virales inadvertidas pueden alterar el sistema inmunológico y confundir la investigación (Kent *et al.*, 2012; Baker, 1998; Crim & Riley, 2012).

En los últimos años, los megalocytivirus han atraído más atención debido a sus impactos ecológicos y económicos en los peces silvestres y cultivados. Se ha encontrado un número creciente de megalocytivirus, incluidos el virus de la necrosis infecciosa del bazo y el riñón (ISKNV) que infecta al pez mandarín, *Siniperca chuatsi*, el iridovirus de la dorada (RSIV) que infecta a la dorada, *Pagrus major* y el iridovirus de la lubina (SBIV) que infecta a la lubina, *Lateolabrax sp.* El iridovirus de la enfermedad del sueño del mero (GIV) que infecta al mero de manchas marrones El ISKNV, agente causal de una enfermedad que causa altas tasas de mortalidad en el pez mandarín y graves daños a los cultivos de este pez en China, se considera la especie tipo de los megalocytivirus. Un virus similar al ISKNV puede infectar a la lubina de boca grande, *Micropterus salmoides* y a más de 50 peces marinos. También informaron sobre un virus aislado del bacalao Murray, *Maccullochella peelii peelii*, que tiene más del 99,9 % de identidad de secuencia con el ISKNV en genes virales clave, como la ATPasa y la proteína principal de la cápside (MCP). Nuestro informe es el primero en proporcionar evidencia de que el ISKNV puede infectar al pez cebra (*Danio rerio*, Cypriniformes) en condiciones experimentales. Al igual que otros miembros de los megalocystivirus, la infección de peces por ISKNV se caracteriza por hipertrofia celular en el bazo, el riñón, el tejido conectivo craneal y el endocardio. Se ha secuenciado todo el genoma de ISKNV. Sin embargo, debido a la ausencia de un modelo animal aplicable para el estudio de las interacciones entre el huésped y el virus, se sabe poco sobre las funciones de los genes de ISKNV (Deng *et al.*, 2000); Kunita *et al.*, 2012).

En nuestro país son varias las instituciones públicas y privadas que utilizan este modelo animal en sus investigaciones pero no se tiene registro de controles sanitarios en las colonias de peces por falta de laboratorios de diagnóstico que los realicen. Las técnicas diagnósticas disponibles a implementarse pueden ser reacción en cadena de

la polimerasa (PCR), cultivos bacteriológicos y exámenes directos o parasitológicos. Una combinación de estas técnicas y un examen general de los animales contribuirá a disponer de un perfil sanitario completo de la colonia de peces.

2 OBJETIVO DEL TRABAJO

El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de ISKNV en bioterios de peces cebra de nuestro país.

3 MATERIALES Y METODOS

3.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras de peces se obtuvieron de instituciones públicas y privadas de nuestro país muestras (pescados) para realizar un control sanitario en los mismos. Los peces fueron sometidos a eutanasia en cada institución y luego enviados congelados (-10 °C) hasta el laboratorio (LAE) donde fueron analizados para los agentes patógenos de la tabla 3.

El procedimiento estándar al recibir a los animales consistió en realizar una anamnesis detallada mediante un cuestionario diseñado para tal fin, que debieron llenar los responsables de las instituciones involucradas. La planilla de encuesta se elaboró de acuerdo a los criterios establecidos por el programa de vigilancia de la salud de los animales y en las recomendaciones internacionales de la Consejo Internacional para la Ciencia Animal de Laboratorio (ICLAS) y la Federación Europea de Asociaciones de Ciencia Animal de Laboratorio (FELASA).

El tamaño de la muestra fue determinado por la fórmula estadística: $A = \alpha \log \log / (1-P)$

A = tamaño muestra, P = porcentaje de animales infectados en la colonia y α = límite de confianza. Siendo $P = 0.25$, $\alpha = 0.05$ y $A = 10$ animales, la probabilidad de detectar al menos un animal positivo en la muestra evaluada fue del 95% (Instituto de Investigación en Animales de Laboratorio) ILAR, 1976.

En base a la bibliografía consultada se implementó un control sanitario en los peces con técnicas moleculares como reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante el diseño de cebadores específicos para cada agente. Se analizaron 50 peces cebra adultos (1 año de edad) provenientes de 5 bioterios (10 peces de cada uno). Se tomaron muestras de tejido visceral de cada animal que fueron procesadas con un equipo comercial para extracción de ADN. Para la detección viral se utilizó una técnica de PCR

directa utilizando cebadores específicos que amplifican un fragmento de 563 pb basado en la secuencia del gen principal de la proteína de la cápside (MCP).

3.2 TÉCNICA DE PCR

El ADN total fue extraído utilizando un equipo comercial para los *pooles* (Ultra Clean™, Mo Bio Bio Laboratories, Inc). Para la detección molecular se diseñó una PCR a partir de un alineamiento múltiple de secuencias del gen que codifica para una proteína específica del agente.

Para la reacción de PCR se utilizaron 5 µl de ADN molde adicionado a la mezcla de reacción (volumen final de 25 µl) constituida por 12 µl de GoTaq ADN polimerasa (Promega, Madison, WI, USA), 6,5 µl de agua libre de nucleasas y 0,75 µl de cada uno de los *primers* específicos para el virus.

Se optimizó la amplificación utilizando diferentes tiempos y temperaturas de ciclado. El protocolo final para todos los *primers* consistió en un ciclo de desnaturalización de 4 minutos a 94 °C, seguido por 35 ciclos y un protocolo específico de amplificación.

El producto final obtenido de cada amplificación se corrió en un gel de agarosa al 1,5% a 100 V durante 45 minutos, se tiñó con SYBR Green (Invitrogen. USA) y se visualizó con un transiluminador de luz azul (Safer Image 2.0; Invitrogen. USA). Se utilizó un control positivo y, como control negativo, se colocó agua libre de nucleasas en lugar del molde de ADN).

4 RESULTADOS Y CONCLUSIONES

De las 5 muestras de peces (*pooles* de 10 peces en cada muestra) donde cada una se corresponde con un bioterio, resultaron positivas las muestras de 7 animales de uno de los bioterios estudiados (Figura 1), siendo 20% la prevalencia del virus en relación al ensayo.

Aproximadamente el 80% de todos los animales utilizados en la investigación son roedores, en comparación con el 10% que son acuáticos. En relación al uso más extenso de los roedores como animales de laboratorio, es necesario comparar los dos grupos animales con respecto a las enfermedades infecciosas. Se ha reconocido a lo largo de los años que utilizar ratones libres de patógenos (SPF) en investigaciones es importante para minimizar variables en los resultados y generar resultados precisos. Aunque algunos investigadores se resisten, este concepto se está aceptando gradualmente por biomédicos de animales acuáticos de laboratorio que usan el pez cebrá como modelo animal. El impacto en los resultados de la investigación, incluso para las enfermedades

más comunes encontradas en bioerios de pez cebrá, no se conoce o describe bien como ocurre en los roedores de experimentación. La preocupación por las enfermedades infecciosas en los peces de experimentación está aumentando a medida que los recursos en las instituciones de investigación se están centralizando, donde la ruptura de barreras de bioseguridad podrían conducir a una rápida propagación de patógenos. Además de las enfermedades agudas que causan morbilidad y mortalidad severas, las condiciones crónicas subyacentes que causan infecciones de bajo grado o subclínicas pueden alterar los resultados de la investigación. Mientras que la aparición de enfermedades subyacentes que causan bajas mortalidades puede ser aceptable para la acuicultura de producción (peces comestibles) o con peces ornamentales, deben evitarse en aquellos (como con cualquier animal de laboratorio) utilizados en la investigación. Los peces ornamentales que se comercializan generalmente se crían en estanques al aire libre y, a menudo, se infectan con una variedad de patógenos y parásitos. Si bien estos a menudo no causan enfermedades clínicas, como se mencionó anteriormente, estas infecciones deben evitarse si los peces se usan para la investigación. Por lo tanto, las estrategias de cuarentena para los peces destinados a la investigación son más complejas que las recomendadas para los peces destinados a un acuario doméstico o público. El estado de salud en la acuicultura de peces destinados a la alimentación también difiere del de los peces de investigación. Las infecciones subclínicas que no afectan la mortalidad y la conversión alimenticia pueden ser aceptables cuando el punto final es la producción de carne, pero deben evitarse, cuando sea posible, en animales de investigación, ya que pueden interferir en los experimentos y resultados. Por ejemplo, un punto final importante en la salud del pez cebrá es la fecundidad. Debe evitarse un microorganismo que causó la reducción de la fecundidad incluso si no es patógeno (Kent *et al.*, 2009).

En este trabajo se observó el hallazgo del ISKN en las colonias de peces cebrá de nuestro país como también la eficiencia de la metodología utilizada en la detección de las infecciones por este agente.

El peligro de infección es escaso en condiciones normales pero la implementación de barreras de bioseguridad (monitoreo constante de los parámetros de agua, esterilización de materiales, remoción de detritus, cuarentena, eliminación de los peces afectados, etc) y prácticas de manejo de acorde a las normativas internacionales es condición necesaria para evitar el ingreso y propagación de este organismo (Laborde & Milocco, 2008).

El estrés en la producción de peces de experimentación a menudo está implicado en enfermedades infecciosas en los bioerios y es un estado fisiológico adaptativo y dinámico que ocurre después de que un organismo percibe una amenaza e intenta

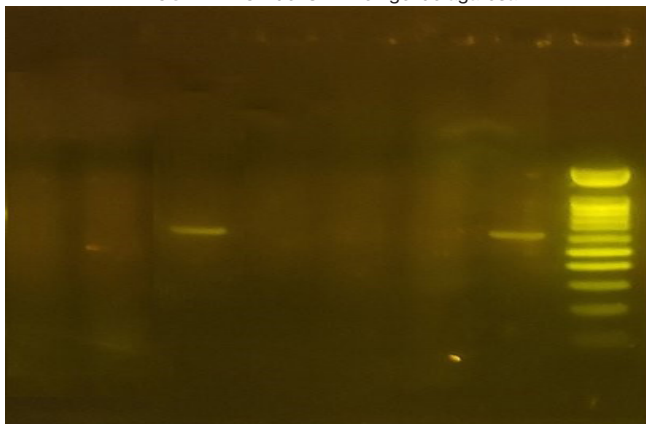
restablecer el equilibrio fisiológico. El estrés crónico y la elevación del cortisol generalmente son inadaptados, lo que resulta en la supresión inmune y una mayor susceptibilidad a las enfermedades infecciosas siendo el cortisol generalmente un indicador de estrés crónico y agudo en los peces. Además, se ha demostrado que el estrés reduce el crecimiento y la aptitud reproductiva de los peces. En condiciones de estrés crónico y elevación de cortisol, la supresión inmune es típica y a menudo contribuye a una mayor prevalencia y morbilidad de las enfermedades en las poblaciones de peces. Se han descrito aumento en el cortisol en peces cebra después del hacinamiento crónico o el estrés de manejo agudo (Mathews, 2001; Ramsay *et al.*, 2009).

El impacto en los resultados de una investigación, incluso para las enfermedades más comunes encontradas en instalaciones o bioerios de pez cebra, no se conoce o describe bien. Por ejemplo, es posible especular que *Pseudoloma neurofilia*, un patógeno primario que infecta el cerebro, la médula espinal y el músculo del pez cebra, podría afectar los estudios que involucran el desarrollo de fenotipos, pruebas de desarrollo de neurotoxicidad, muerte celular específica del cerebro, investigación conductual y desarrollo musculo esquelético. También se conoce que la micobacteriosis, causa nódulos en varios órganos internos y puede conducir a nefritis granulomatosa, hepatitis que podrían afectar la función renal y hepática, el sistema inmunitario y la expresión de enfermedades en peces genéticamente modificados. El control de virus de rutina en roedores de laboratorio, estos métodos generalmente se realizan como ensayos de anticuerpos con antígenos conocidos para delinear la especificidad de la cepa y, por lo tanto, la etiología de la respuesta del anticuerpo viral. Además de la falta de información sobre virus potencialmente importantes en la mayoría de los peces de laboratorio, rara vez se utilizan pruebas serológicas para detectar virus en peces en general. La disponibilidad de ratones libres de patógenos específicos (SPF) es por lo tanto una piedra angular en la investigación y mientras que los salmónidos SPF son accesibles, este concepto se ha adoptado recientemente para el pez cebra. Debido a que muchos patógenos acuáticos u organismos oportunistas colonizan las biopelículas en los filtros biológicos, en acuarios y tuberías, entonces el estado actual del conocimiento sobre las mejores prácticas de cría y los diseños de sistemas es posible deba ser reevaluado para mantener los peces SPF en sistemas cerrados de recirculación de agua para mantener peces cebra. La confirmación de que un pez es definitivamente SPF se basa en el supuesto de que la prueba de diagnóstico es 100% sensible. Además, como la mayoría de las pruebas de diagnóstico para peces requieren muestras de animales a sacrificar, la designación de una colonia para ser considerada SPF se basa en el número de peces muestreados (Kent *et al.*, 2009).

En este trabajo fue posible adecuar una metodología molecular para realizar controles sanitarios en peces cebra. Y en la técnica de PCR desarrollada se concluyó que resulta ser una metodología eficiente en la detección de infecciones por patógenos, como así también se informó por medio de la misma, porcentajes de muestras con resultados positivos de dicho agente en los bioterios de peces cebra de Argentina

Hasta el momento estos controles no se habían implementado en nuestro país para los agentes patógenos en pez cebra, por lo que los conocimientos obtenidos a través de este trabajo otorgan una ventaja para posteriores estudios tanto en el control sanitario de esta especie como en otras de peces que posean infecciones producidas por el ISKN. Como proyección, este estudio deja los cimientos para posteriores investigaciones sobre control sanitario de agentes patógenos que afectan el pez cebra siendo esto fundamental para plantear a futuro soluciones de manejo y control sanitario en bioterios de peces de experimentación como poseer indicadores tempranos de la presencia de infecciones y tratamientos que permitan contener y/o erradicar patógenos de las colonias de peces utilizados en experimentación.

FIGURA 1. PCR de ISKNV en gel de agarosa.



Columna N° 3: muestra positivas para ISKNV (563 pb);

Columna N° 1, 2, 4 y 5: muestras negativas;

Columna N° 6: control negativo;

Columna N° 7: control positivo;

Columna N° 8: Marcador Molecular (Biodynamics). Tinción con SYBRGreen.

BIBLIOGRAFÍA

1. Astrofsky, K.M., C.M. Harper, A.B. Rogers, and J.G. Fox. 2002. Diagnostic techniques for clinical investigation of laboratory zebrafish. *Lab Animal* 31: (3): 41- 45.
2. Astrofsky, K.M., M.D. Schrenzel, R.A. Bullis, R.M. Smolowitz, and J.G. Fox. 2000. Diagnosis and management of atypical *Mycobacterium* spp. Infections in established laboratory zebrafish (*Brachydanio rerio*) facilities. *Comp. Med.* 50:666-672.

3. Baker DG. Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11:231–26.
4. Collymore C., Crimm J., Lieggi G. Recommendations for Health Monitoring and Reporting for Zebrafish Research Facilities. Volume 13, Supplement 1, 2016.
5. Crim MJ, Riley LK. Viral diseases in zebrafish: what is known and unknown. *ILAR J.* 2012;53(2):135-43. doi: 10.1093/ilar.53.2.135.
6. Deng Min, D. M., He JianGuo, H. J., Zuo Tao, Z. T., Weng ShaoPing, W. S., Zeng Kang, Z. K., Lu Ling, L. L., ... & Long QingXin, L. Q. (2000). Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) from *Siniperca chuatsi*: development of a PCR detection method and new evidence of iridovirus.
7. Dietrich, H. W., Westerfield, M., and Zon, L. T. (1999a). The zebrafish: Biology. In "Methods in Cell Biology" (L. Wolson and P. Matsudaira, ed.), Vol. 59. Academic Press, San Diego.
8. Dietrich, H. W., Westerfield, M., and Zon, L. T. (1999b). The zebrafish: Genetics and genomics. In "Methods in Cell Biology" (L. Wolson and P. Matsudaira, ed.), Vol. 59. Academic Press, San Diego.
9. Driever, W., Stemple, D., Schier, A., and Solnica-Kriezel, L. (1994). Zebrafish: Genetic tools for studying vertebrate development. *Trends Genet.* 10, 152-159.
10. Driever, W., Solnica-Krezel, L., Schier, A. E, Neuhaus, S. C., Malicki, J., Stemple, D. L., Stainier, D. Y., Zwartkruis, E, Abdelilah, S., Rangini, Z., Belak, J., and Boggs, C. (1996). A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development* 123, 37-46.
11. Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M. C., Hammerschmidt, M., Kane D. A., Odenthal, J., van Eeden, E J., Jiang, Y. J., Heisenberg, C. P., Kelsh, R. N., Furutani-Seiki, M., Vogelsang, E., Beuchle, D., Schach, U., Fabian, C., and Nusslein-Volhard, C. (1996). The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123, 1-36.
12. Jagadeeswaran, P., and Liu, Y. C. (1997). A hemophilia model in zebrafish: Analysis of hemostasis. *Blood Cells Mol. Dis.* 23, 52-57.
13. Kahn, P. (1994). Zebrafish hit the big time. *Science* 264, 904-905.
14. Kent, M.L., S.W. Feist. C. Harper, S. Hoogstraten-Miller, J.M. Law, J.M. Sanchez-Morgado, R.L. Tanguay, G.E. Sanders, J.M. Spitsbergen, and C.M. Whipps. 2009. Recommendations for control of pathogens and infectious diseases in fish research facilities. *Comp. Biochem. Physiol Part C (Toxicol. Pharmacol.)* 149: 240-248.
15. Kent ML, Harper C, Wolf JC. Documented and potential research impacts of subclinical diseases in zebrafish. *ILAR J.* 2012;53:126–134.
16. Kurita, J.; Nakajima, K. Megalocytiviruses. *Viruses* **2012**, *4*, 521-538. <https://doi.org/10.3390/v4040521>
17. Laborde J, Milocco S. Temas de zoonosis IV. Zoonosis en peces de experimentación. 1º Edición. junio 2008. ISBN: 987-97038-3-0. 49:439-445.
18. Matthews, J.L., A.M.V. Brown, K. Larison, J.K. Bishop-Stewart, J.K., P. Rogers, and M.L. Kent. 2001. *Pseudoloma neurophilia* n.g., n.sp., a new genus and species of Microsporidia from the central nervous system of the zebrafish (*Danio rerio*). *J. Euk. Microbiol.* 48:229-235.

19. Postlethwait, J. H., and Talbot, J. (1997). Zebrafish genomics: From mutants to genes.
20. Ramsay, J.M., Watral, V., Schreck, C.B., Kent, M.L. 2009. *Pseudoloma neurophilia* (Microsporidia) infections in zebrafish (*Danio rerio*): Effects of stress on survival, growth and reproduction. Dis. Aquat. Org. (in press).
21. Rubinstein AL. Zebrafish: from disease modeling to drug discovery. Curr Opin Drug Discov Devel. 2003;6:218–223.
22. Weinstein, B.M., Stempel, D.L., Driever, W., & Fishman, M.C. (1995). Gridlock, A localized, heritable defect of vascular patterning in zebrafish. Nat. Medicine. 1, 1143-1147.

SOBRE O ORGANIZADOR

Manuel Simões é licenciado em Engenharia Biológica e doutorado em Engenharia Química e Biológica. Atualmente é Professor Associado com Agregação e Pró-Diretor da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP), e investigador sénior do Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia (LEPABE) do Departamento de Engenharia Química da FEUP. Nos últimos anos esteve envolvido em 10 projetos nacionais (5 como investigador principal) e 6 projetos europeus. Foi membro do comité de gestão da ação COST BACFOODNET (Rede Europeia para Mitigação da Colonização e Persistência Bacteriana em Alimentos e Ambientes de Processamento de Alimentos) e esteve envolvido em outras 2 ações: iPROMEDAI e MUTALIG. Manuel Simões tem mais de 190 artigos publicados em revistas indexadas no Journal of Citation Reports, 4 livros (1 como autor e 3 como editor) e mais de 40 capítulos em livros. Ele é Editor Associado para o jornal Biofouling - The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research (o periódico mais antigo sobre pesquisa em biofilme), Editor Associado para o jornal Frontiers in Microbiology e Section Editor-in-Chief para o jornal Antibiotics. Seus principais interesses de pesquisa estão focados nos mecanismos de formação de biofilme e seu controlo com agentes antimicrobianos, particularmente usando novas moléculas antimicrobianas, e no uso de microalgas para tratamento de efluentes. É um dos investigadores mais citados do mundo (top 1%), tendo sido distinguido nos últimos dois anos no índice Essential Science Indicators, um dos mais prestigiados indicadores da qualidade de investigação.

Identificação SCOPUS: 55608338000; Nº orcid: 0000-0002-3355-4398

ÍNDICE REMISSIVO

A

ADN 22, 29, 30, 36, 37, 39, 40

C

Calidad y productividad 69, 105

Cellular senescence 13, 17, 18, 19, 20, 21

Células de cáncer 1, 2

Chronoarchitecture 13, 18, 19, 20

Citotoxicidad 1, 2, 4, 5

Comercio justo 69, 104, 107, 108

Comunidades Tének 69, 71, 77, 78, 79, 80, 84, 87, 88, 93, 100, 101, 102, 103, 104, 107, 109, 112, 114, 115, 116

D

Desarrollo sostenible 68, 69, 70, 71, 87, 92, 93, 108, 111, 114, 115, 116

E

Endogamia 46, 48

Evaluación sensorial 54

F

Fenol cloroformo 36, 37, 39

H

Heterochrony 13, 18

Hibridación 46, 47, 48

I

Iridovirus 22, 28, 34

L

Lacasa 1, 2, 3, 4, 9

M

Maíz pigmentado 46

N

Neurodegeneration 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21

Neuronal death 13, 14, 15, 16, 17, 19

P

PCR 22, 29, 30, 33, 34, 36, 37, 40, 41, 42

Pez cebra 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33

Piloncillo artesanal 69, 70, 73, 86, 87, 92, 107, 108, 111

Proteína de insecto 54

Q

Quercetina 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10

S

Salchichas 54, 56, 57, 58, 61, 62, 63, 64, 65

Sphenarium purpurascens 54, 55, 57, 64, 65, 67

U

Ultrasonido 54, 56, 57, 58, 60, 61, 62, 64, 65

Z

Zea mays L. 46, 52