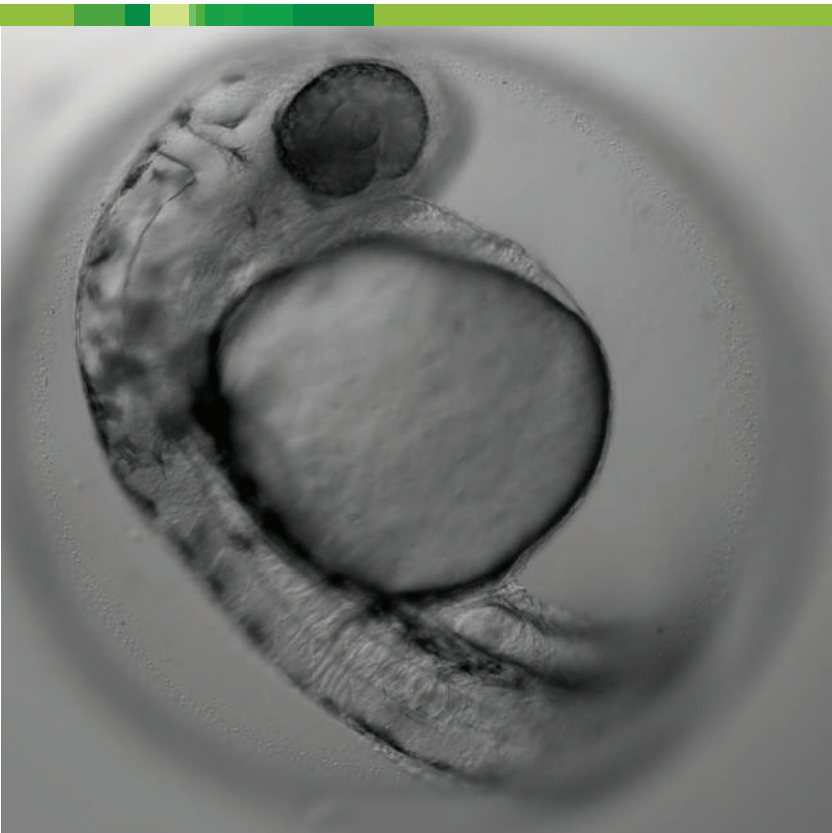


REVISTA DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA PARA LAS CIENCIAS DEL ANIMAL DE LABORATORIO

# ANIMALES DE LABORATORIO

Invierno 2015. Número 64



## EL PEZ CEBRA

La reproducción del  
Danio cebra en laboratorio

El pez cebra como modelo  
experimental en Nanotoxicología

Gestión de alarmas en animalarios.  
Un caso práctico



Entrevista: Joana Visa Esteve  
Responsable de Bienestar Animal  
Institut d'Investigació Biomèdica  
de Bellvitge (IDIBELL)



# Centrados en su investigación.

Como proveedor global de modelos de alta calidad de investigación, dietas y servicios de asistencia, Harlan Laboratories ha demostrado su rendimiento con equipos de investigación en todo el mundo. Nuestra misión es la de ayudarle a mejorar sus investigaciones.

Para más información, visite nuestra Web [www.harlan.com](http://www.harlan.com) o contacte con nosotros en [rms.es@harlan.com](mailto:rms.es@harlan.com)

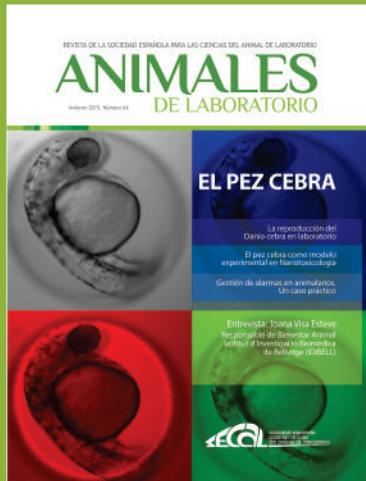
Modelos

Dietas

Servicios



## Grupo Editor



### REVISTA DE LA SOCIEDAD

ESPAÑOLA PARA LAS  
CIENCIAS DEL ANIMAL  
DE LABORATORIO  
www.secal.es

### DIRECTORA

Teresa Rodrigo Calduch  
direccion.revista@secal.es

### SUBDIRECTOR

Hernán Serna Duque  
direccion.revista@secal.es

### EDITORES DE ESTILO E IMAGEN

Olga Fernández Rodríguez  
Juan de Dios Hourcade Bueno  
Lara Sedó Cabezón

### PUBLICIDAD

Amaia Enbeita  
publicidad.revista@secal.es

### FOTO DE PORTADA

Larva Warhol, autor: José María Lacave

### DISEÑO Y MAQUETACIÓN

CONEXION E.P.  
clientes@agenciaconexion.com.co

### IMPRIME

### LCS REPROGRAF

DEPÓSITO LEGAL  
M-1362-1999

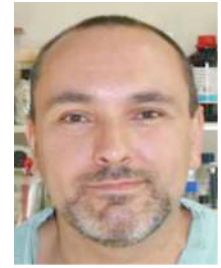
## Responsables Secciones



**NOTICIAS SECAL  
ACTUALIDAD**  
Cristina Gerbolés Freixas  
kgerboles@gmail.com



**TÉCNICAS**  
María Granada Picazo  
mgpicazo@sescam.jccm.es



**ÉTICA Y LEGISLACIÓN  
SEGURIDAD EN 5 MINUTOS**  
Jesús Martínez Palacio  
jesus.martinez@ciemat.es



**¿Y TÚ QUÉ OPINAS?**  
José Luis Martín Barrasa  
jimbarrasa@gmail.com



**LIBROS Y PÁGINAS WEB**  
Daniel Baizán Vicent  
baizan@vivotecnica-ms.com



**FACTOR HUMANO**  
Javier Fidalgo Fernández  
fidalgo@ocelata.com



**AL CUIDADO**  
Paloma García Potrero  
pgarcia@srv.cnio.es



**PANORAMA**  
Luis Muñoz de la Pascua  
imp@usal.es



**CONTROL SANITARIO**  
Sara Capdevila i Larrripa  
scapdevila@prbb.org

## Junta de Gobierno

### PRESIDENCIA

Javier Guillén Izco (2011-2015)

### VICEPRESIDENCIA

Antonio Martínez Escandell (2013-2017)

### SECRETARÍA

Elena Ciordia Balduz (2011-2015)

### VICESECRETARÍA

Ángel Naranjo Pino (2013-2017)

### TESORERÍA

Isabel Blanco Gutiérrez (2011-2015)

### VICETESORERÍA

Carlota Largo Aramburu (2013-2017)

### VOCALÍAS

Rosa Bonavía Abril (2011-2015)  
Juan de Dios Hourcade Bueno (2013-2017)  
Leticia Martínez Caro (2011-2015)  
NorayBio (2013-2017)  
Luis Parra García (2011-2015)  
Anna Puyol Altarriba (2011-2015)  
María Reyes Panadero (2013-2017)  
Juan Rodríguez Cuesta (2013-2017)

### SOCIOS BENEFACTORES:

ANADE  
ANIMALARIA  
ANTONIO MATACHANA S.A.  
BIOESCAPE GmbH  
BIOSIS S.L.  
CENTRE D'ELEVAGE JANVIER  
CHARLES RIVER LABORATORIES  
DINOX S.L.  
DYNAMIMED  
ETYCA S.L.  
GLAXO SMITHKLINE  
GRANJA S. BERNARDO  
HARLAN LABORATORIES MODELS  
MEVION TECHNOLOGY S.L.  
IZASA S.A.  
NIRCO S.L.  
NORAY BIOINFORMATICS S.L.U.  
PANLAB S.L.U.  
RETTENMAIER IBERICA S.L.  
SODISPAN RESEARCH SL  
SOURALIT  
SDS DIETEX FRANCE  
STERILTECH S.L.  
STERIS  
VESTILAB S.A.  
VIVOTECNIA



Foto: shutterstock

# Un modelo al lado de los humanos

## SU RIÑÓN, DISEÑADO "A LA CARTA" POR BIOINGENIERÍA, ABRE UN ESPERANZADOR ENFOQUE EN EL TRASPLANTE RENAL.

La enfermedad renal crónica supone un problema mundial de salud pública. Aunque aproximadamente 2 millones de personas en el mundo disfrutan de tratamiento renal sustitutorio (diálisis y trasplante renal), éstos probablemente representan menos del 10% de los enfermos que lo necesitan. Además, el trasplante de riñón también se ve seriamente afectado por la supervivencia del injerto y limitado por la escasa disponibilidad de donantes.

Líneas de investigación innovadoras en bioingeniería se están llevando a cabo para superar estos desafíos. De este modo, un riñón desculturizado de este cerdo, y vuelto a recelularizar con sus propias células madre, permite diseñar un nuevo órgano funcional como una opción, cada vez más cercana, de tratamiento en la enfermedad renal terminal.



[www.secal.es](http://www.secal.es)

# INDICE

## EDITORIAL

### 8 NOTICIAS

- Actividades de la SECAL.
- VI Jornada Científica SECAL.

### 12 ACTUALIDAD

- Comunicación hígado - cerebro para regular el apetito.
- Desarrollo del epicardio y su papel en la regeneración.
- Gen esencial para el desarrollo del corazón.
- América del Sur en números.

### 16 ARTÍCULOS

- La reproducción del Danio cebra en laboratorio.
- El pez cebra: ¿el nuevo aliado de la industria alimentaria?
- El pez cebra como modelo experimental en nanotoxicología.

### 46 TÉCNICAS

- Administración de fármacos por vía oral mediante gelatina en el pez cebra.

### 50 PANORAMA

- Gestión de alarmas en animalarios. Un caso práctico.

### 54 FACTOR HUMANO

- Complejidad.

### 58 AL CUIDADO

- "Mi día a día".

### 62 SEGURIDAD EN 5 MINUTOS

- Evaluación de riesgos por manipulación de productos químicos: método simplificado.

### 65 CONTROL SANITARIO

- El control sanitario en el pez cebra: De dónde venimos y adónde vamos.

### 69 LIBROS Y PÁGINAS WEB

- Investigación transparente.

### 72 ¿Y TÚ QUÉ OPINAS?

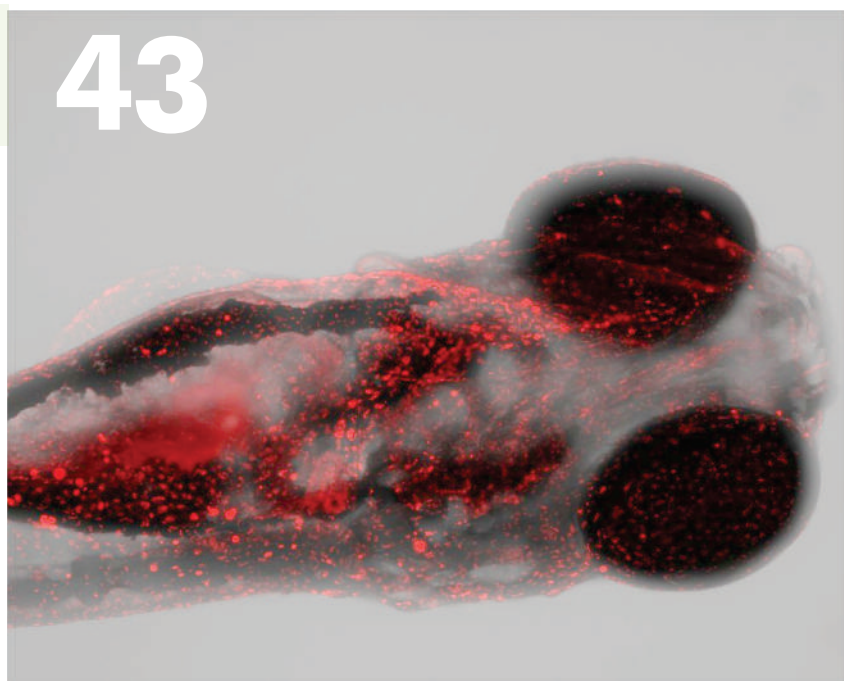
- Conjuntivitis crónica en ratones: papel de los agentes oportunistas.

### 75 ENTREVISTA

- Joana Visa Esteve.

### 78 CRUSECAL 64

43





INSTRUMENTACIÓN E INSTALACIONES CIENTÍFICAS

C/. Laguna del Marquesado 14, Nave 1  
28021 MADRID  
Teléfono: 91 710 95 47  
Fax: 91 796 65 52  
E-mail: [steriltech@steriltech.net](mailto:steriltech@steriltech.net)  
[www.steriltech.net](http://www.steriltech.net)

## Proteja su Investigación de la Contaminación con la Tecnología Clarus™ Peróxido de Hidrógeno Vaporizado



- Totalmente escalable
- Libre de residuos
- Baja Temperatura
- Excelente compatibilidad de materiales



**CLARUS™ Z**  
Especialmente diseñado para salas  
▪ Salas hasta 500 m<sup>3</sup>



**CLARUS™ C**

- SAS Biológicos
- Salas hasta 350 m<sup>3</sup>
- Racks Ventilados
- Aisladores
- Lava-racks



**CLARUS™ L**

- Racks Ventilados
- Aisladores
- Incubadores de CO<sub>2</sub>
- Lava-racks



BMT Iberia, s.l.  
C/. Laguna del Marquesado 14, Nave 1  
28021 MADRID  
Teléfono: 91 7230347  
Fax: 91 5054494  
E-mail: [bmtiberia@steriltech.net](mailto:bmtiberia@steriltech.net)  
[www.bmtiberia.es](http://www.bmtiberia.es)

## Esterilizadores a Vapor STERIVAP HP IL, VAKULAB, UNISTERI



## El pez cebra

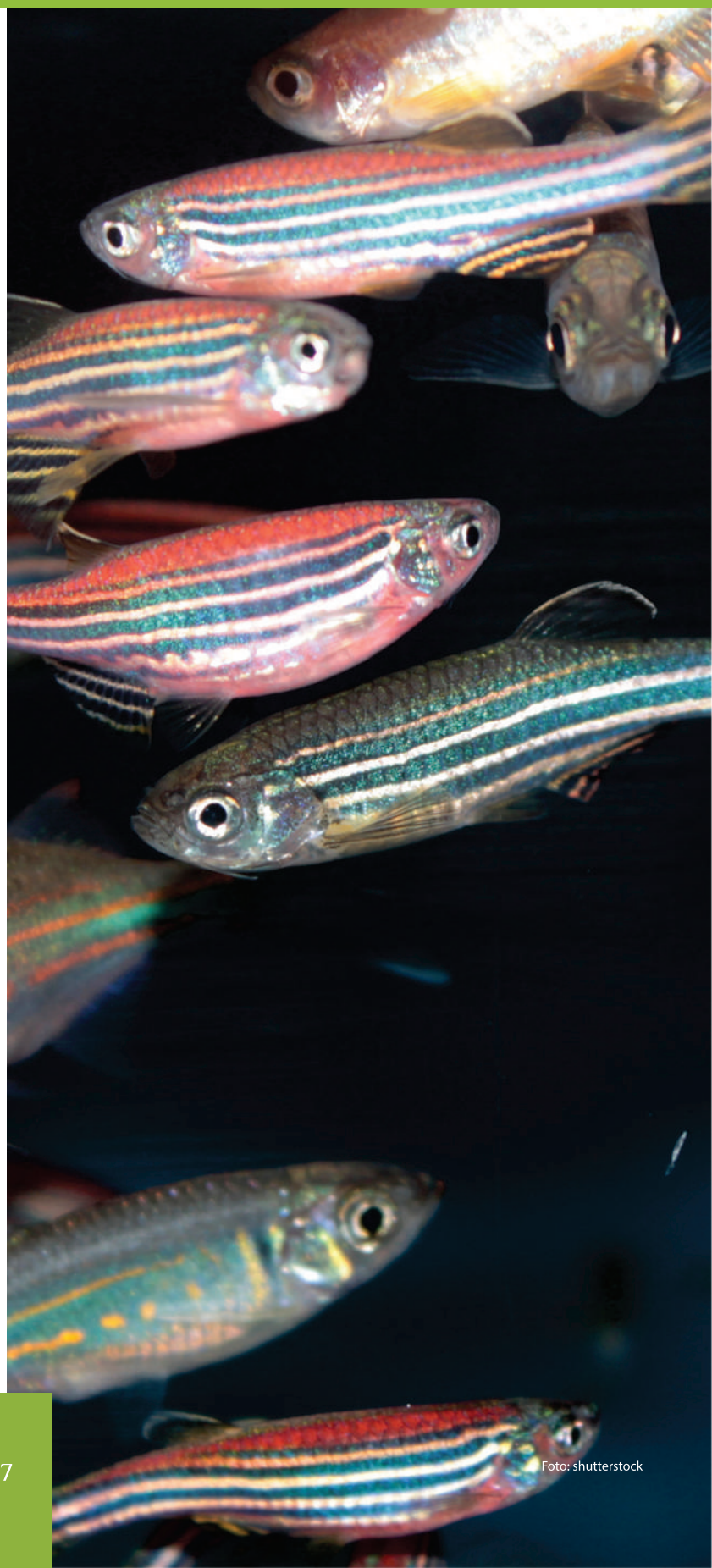
Ya en 1981, Streisinger publicó el primer artículo en el que aparecía el pez cebra como modelo para el análisis genético del desarrollo embrionario en vertebrados. Sin embargo, la verdadera popularidad del pez cebra tuvo lugar en 1996, cuando la revista *Development* publicó un número especial (conocido como el "Zebrafish issue"). Basándose en sus trabajos anteriores con la mosca del vinagre (*Drosophila Melanogaster*) y por el que le concedieron el Premio Nobel, Nusslein-Volhar y su equipo consiguieron identificar unas 2000 mutaciones que afectan a todas las fases del desarrollo embrionario.

En el Séptimo Informe sobre las estadísticas relativas al número de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos en los Estados miembros de la Unión Europea, se presenta una tabla comparativa entre los porcentajes de clases de animales utilizados desde el 1996 hasta el 2011. El porcentaje de animales de sangre fría utilizados sólo se ve superado por el grupo de roedores-conejos, y los incrementos en el mismo se deben a los peces, y fundamentalmente al pez cebra.

Éste es el tercer número de la revista dedicado al pez cebra. Los dos primeros números (el 34 y 35, que se publicaron en el 2006 y el 2007, respectivamente), se centraron principalmente en la descripción de las características básicas del pez cebra y de los primeros campos de aplicación de esta especie como modelo. El actual número se centra más en la reproducción del pez cebra y en su validez como modelo en dos nuevas áreas: la industria alimentaria y la nanotoxicología.

A lo largo de estos años e incluso en la actualidad, la utilización del pez cebra como modelo experimental sigue ampliándose a nuevos campos científicos en los que se demuestra ser un modelo válido.

Dirección Revista SECAL



## Actividades de la SECAL

El 28 de octubre de 2014 se celebró una Reunión Ordinaria de la Junta de Gobierno de la SECAL. Asimismo, el 20 de noviembre de 2014 y tras la finalización de las presentaciones de la Jornada Científica, se celebró la Asamblea General Ordinaria de la sociedad. A continuación, se presenta un resumen de los principales temas tratados en ambas reuniones.

### Relaciones internacionales

#### Laboratory Animals Ltd. (LAL)

En relación a las negociaciones para unificar los criterios establecidos entre LAL y las Sociedades Científicas en cuanto a los descuentos según el porcentaje de suscripciones, se informa de que se han establecido sistemas de pago por franjas de porcentajes pero que no se aplicarán hasta el 2016, por lo que las nuevas cuotas, con o sin revista, no se presentarán hasta la próxima asamblea general.

Se informa que LAL va a apostar por un mayor peso de la revista en formato electrónico y se recuerda que aparte de ésta, LAL también realiza actividades formativas, traducciones de recomendaciones, etc.

#### International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS)

Se informa que en 2015 son las elecciones a la Junta de Gobierno de ICLAS. Actualmente, el representante de SECAL en ICLAS es Javier Guillen. Patri Vergara es la Presidenta actual de ICLAS y representa a España como miembro nacional.

ICLAS ha otorgado en el 2014 y dentro del programa europeo de formación, 7 becas a personas del este de Europa para estancias formativas en centros de Europa occidental.

#### Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA)

Se informa que Belén Pintando ha sido elegida como Vicepresidenta de Relaciones Internacionales de FELASA. Ignacio Álvarez y Juan Rodríguez, en sustitución de Belén Pintando desde el 1 de enero de 2015, son los representantes de SECAL en FELASA.

Los grupos de trabajo que hay actualmente en FELASA son:

- Conjuntamente con AALAS-FELASA:
  - Análisis ético riesgo/beneficio.
  - Control sanitario para el intercambio de roedores.
- Cuidado de Cefalópodos. Ya se tiene el documento final que será publicado en el 2015.
- Clasificación de severidad y análisis retrospectivo.
- Glosario de signos clínicos se publicará en breve en *Laboratory Animals*.
- Monitorización sanitaria de primates no humanos.
- Cuidados del pez cebra.
- Garantía de calidad y monitorización genética en roedores.
- Nutrición en roedores.

Por otro lado, se informa de la propuesta de creación de una red de "Animal Welfare Officers" en Europa con subredes nacionales. Juan Rodríguez es el encargado de llevar a cabo esta propuesta en España.

### Relaciones nacionales

#### Confederación de Sociedades Científicas de España (COSCE)

COSCE ha formado un grupo que se encargará de la comunicación a la sociedad acerca de la investigación con animales y que está elaborando un documento que podrá ser utilizado en un futuro próximo.

COSCE ha propuesto a SECAL participar en el Proyecto DECIDES (Debates sobre ciencia y desarrollo económico y social). Se piden voluntarios para participar como expertos.

### Relaciones con el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) y el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO)

Para formalizar la relación con el MAGRAMA se va a firmar un convenio de colaboración. Se recuerda la última participación de Pilar León en el Seminario explicativo para la cumplimentación de las tablas estadísticas que organizó la SECAL el 24 de junio en Madrid.

Por otro lado, SECAL ha establecido una relación con el MINECO por ser el encargado de desarrollar la orden ministerial de formación. Fruto de esta relación se ha producido la participación de Salvador Fortes en la VI Jornada Científica de la SECAL.

### **Otras actividades**

#### Congreso SECAL-SPCAL 2015

El próximo congreso de la SECAL se celebrará en Cáceres los días 18, 19 y 20 de noviembre de 2015. Este congreso está organizado junto con la sociedad portuguesa, SPCAL.

María Reyes presenta la sede del congreso, el Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón (CCMIJU), la oferta científica preparada en forma de talleres y sesiones científicas y la oferta lúdico-festiva de Cáceres. La cena de gala no estará incluida en la inscripción del congreso y se celebrará en el Castillo de la Arguijuela.

#### Convenios

- En el convenio que SECAL tiene con el Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid (COLVEMA), SECAL adquiere el compromiso de publicar dos artículos al año en la revista de COLVEMA. Esta labor se está llevando a cabo por los miembros de la Junta pero se pide colaboración a los socios para cumplir con esta obligación.

- SECAL ha acordado con la Asociación Española de Bioseguridad (AEBios) y con la Sociedad Española de Garantía de Calidad en Investigación (SEGCIB), una reducción en las cuotas de inscripción de las actividades organizadas por cada una de ellas para los socios de la otra.

### Formación

Se han introducido novedades en el Libro Blanco de Formación que se puede consultar en la página web de la SECAL. Algunas de estas novedades son: la simplificación de las solicitudes en dos convocatorias a lo largo del año, el aumento de la cuantía de las becas de 300 a 400 €, establecimiento de ayudas de viaje para asistir a la jornada científica.

El presupuesto de la vocalía de formación corresponde al 50% de los ingresos por cuotas de socios y durante el 2014, se ha consumido el 75% de este presupuesto. Se han concedido 15 becas para asistencia a actividades formativas, 6 ayudas de viaje para la jornada científica, 4 convenios de patrocinio y 1 convenio de co-organización.

### Y también...

- El libro "Ciencia y Tecnología del animal de Laboratorio" se está publicando en formato DVD, USB y Libro electrónico. Jose M<sup>a</sup> Orellana y Jesús Martín Zúñiga han cedido a la SECAL los derechos de autor.
- Se ha iniciado un nuevo grupo de trabajo: Estudio de bienestar en líneas de animales modificados genéticamente.
- SECAL estrena una nueva web.
- La Revista "Animales de Laboratorio estrena 3 secciones nuevas en el 2015: Al Cuidado (a cargo de Paloma García), Panorama (a cargo de Luis Muñoz de la Pascua) y Controles Sanitarios (a cargo de Sara Capdevila).

[www.secal.es](http://www.secal.es)



## VI Jornada Científica de la SECAL

### VI Jornada Científica de la SECAL

El 20 de noviembre de 2014, se celebró en Barcelona la VI Jornada Científica de la SECAL bajo el lema: “**Aprender es adaptarse: Formación para el cambio**”. El evento tuvo lugar en la Sala Llimona del Hotel Catalonia Barcelona Plaza.

La inauguración de la Jornada corrió a cargo del Presidente de la SECAL, Javier Guillén, quien agradeció el trabajo realizado a los organizadores de la jornada y el apoyo a los patrocinadores de la misma.



La jornada fue todo un éxito tanto por la asistencia de aproximadamente 180 personas, como por la calidad de los cuatro ponentes.

Salvador Fortes del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) inició la jornada con la presentación titulada: **Requisitos de capacitación en el manejo de animales de experimentación. Nueva Regulación**. Tras la presentación de la normativa y de las guías y directrices comunitarias sobre la capacitación del personal que utiliza animales con fines científicos y docencia, nos explicó el estado actual de la Orden Ministerial que en breve establecerá los requisitos de formación del personal.

A continuación, Angel Naranjo del Centro Nacional de Biotecnología del CSIC, bajo el título de **Signos Clínicos: Técnicos en acción**, nos argumentó el papel crucial que debe tener el personal técnico a la hora de identificar los signos clínicos de los animales, ya que es el personal que interacciona más tiempo con los animales y que tiene mayor capacidad de reconocer sus



alteraciones. En ese sentido, hizo hincapié en la importancia de la mejora en la formación de los técnicos y en la elaboración de protocolos de supervisión del bienestar animal que permitan realizar descripciones objetivas y sencillas.



Después de una pausa-café, tuvimos la oportunidad de escuchar la ponencia **Modelos de Biobanco de tejidos obtenidos de animales de experimentación con fines de investigación biomédica**, a cargo de Maria Antonia Fortuño del Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) de la Universidad de Navarra. Tras argumentar por qué el establecimiento de un biobanco de tejidos de animales de experimentación es un imperativo ético y una recomendación jurídica, presentó los diferentes modelos organizativos de biobancos y la importancia de realizar un diseño sostenible con unos objetivos científicos bien definidos. Finalmente, identificó y explicó los diferentes procesos operativos que deben garantizar la trazabilidad y la calidad de las muestras y datos asociados de un biobanco.



Por último, César Eguiluz Fernández del Centro Nacional de Microbiología (CNM) del Instituto de Salud Carlos III, se hizo cargo de la presentación sobre **Controles microbiológicos ambientales y de agua en un animalario**. El objeto principal de esta ponencia fue la presentación de las conclusiones a las que ha llegado el Grupo de Trabajo de Controles Microbiológicos Ambientales y de Agua de la SECAL, compuesto por el mismo César Eguiluz, junto con S. Grané, P.J. Cardona, J. Bravo y L. Parra como coordinador. Tras especificar los objetivos y la metodología utilizada, nos presentaron las conclusiones/recomendaciones en relación a los puntos de control microbiológico, parámetros a estudiar, periodicidad de los controles, valores recomendados y acciones correctoras tanto para superficies y aire, como para el agua de los animalarios.

Una jornada interesante y muy enriquecedora, que culminó con la Asamblea General de socios de la SECAL.

TÚ TAMBIÉN  
PUEDES SER  
PARTE DE  
LA SECAL  
¡HAZTE SOCIO!

[www.secal.es](http://www.secal.es)

 sociedad española  
para las ciencias  
del animal de laboratorio

# Comunicación hígado - cerebro para regular el apetito

Los pacientes diabéticos no acumulan bien la glucosa en el hígado, donde se almacena el azúcar sobrante que luego se libera en función de las necesidades energéticas del cuerpo. Por primera vez, un estudio científico demuestra una conexión entre el hígado y el apetito, lo que permite nuevos tratamientos para mejorar la diabetes y la obesidad.

«El hígado almacena la glucosa sobrante en forma de glucógeno (cadenas de glucosa) que luego libera según las necesidades energéticas del cuerpo. Los pacientes diabéticos sufren hiperglucemia, es decir, tienen demasiado azúcar en sangre, en parte porque no acumulan bien la glucosa en el hígado»

Un estudio liderado por Joan J. Guinovart del Instituto de Investigación Biomédica (IRB) de Barcelona y publicado en la revista *Diabetes*, demuestra que el hígado con altas reservas de glucosa evita que los pacientes engorden, incluso cuando se les ofrece una dieta muy apetitosa, ya que se sienten saciados. Es la primera vez que se observa la conexión entre el hígado y el apetito.

Generaron ratones que sobreexpresaban la proteína diana del glucógeno en el hígado, lo que resulta en un aumento de glucógeno hepático. Incluso dándoles una dieta apetitosa, alta en grasas, los ratones que acumularon más glucógeno en el hígado no engordaron. Además de comprobar que comieron menos, los científicos observaron que en el cerebro de estos ratones había escasas moléculas estimulantes del apetito, mientras que tenían muchas más moléculas depresoras del mismo. Finalmente, hallaron la señal que podía explicar la conexión hígado-cerebro: el ATP (trifosfato de adenosina), una molécula utilizada por todos los organismos vivos para proporcionar energía a las células, y que está habitualmente alterada en la diabetes y la obesidad.

También comprobaron que tras una noche de ayuno, estos animales presentaron un alto contenido de glucógeno en hígado, y concentraciones séricas bajas de ácidos grasos en comparación con los ratones control, independientemente de si recibieron una dieta rica en grasas o una dieta estándar.

En conclusión, la acumulación de glucógeno en hígado causó una reducción de la ingesta de alimentos, una protección sobre los efectos deletéreos de una dieta rica en grasas y una disminución del impacto metabólico del ayuno.

Los investigadores del IRB argumentan que el aumento de la producción de glucógeno hepático podría ser un tratamiento eficaz para la diabetes y la obesidad.



Foto: Shutterstock

<http://www.agenciasinc.es/Noticias/Higado-y-cerebro-se-comunican-para-regular-el-apetito>

I. López-Soldado, D. Zafra, J. Duran, A. Adrover, J. Calbó, and J.J. Guinovart. **Liver glycogen reduces food intake and attenuates obesity in a high-fat diet fed mouse model.** *Diabetes* 2015, 64(3):796-807. doi: 10.2337/db14-0728.

## Desarrollo del epicardio y su papel en la regeneración

El epicardio es una capa epitelial unicelular que recubre el miocardio. Durante el desarrollo, las células derivadas del epicardio se desprenden desde el epicardio embrionario y dan lugar a células endoteliales vasculares y del músculo liso de la vasculatura coronaria y a fibroblastos intracardiacos.

En el adulto, las lesiones del miocardio conducen a una rápida reexpresión de los genes epicárdicos. Otra respuesta temprana al daño cardíaco es la formación de una capa epicárdica engrosada sobre el área afectada.

Estas observaciones sugieren el rol del epicardio, bien como tejido señalizador o bien como fuente de progenitores celulares durante la regeneración cardíaca.

«El corazón del pez cebra es un modelo implantado con solidez para el estudio de la regeneración cardíaca dada su capacidad de regenerar el tejido dañado»

El pez cebra se utiliza como sistema modelo para analizar los mecanismos moleculares de la formación del epicardio *in vivo*. Recientemente, el grupo de liderazgo por Natalia Mercader del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) ha descrito el uso de la criocauterización para provocar el daño cardíaco en el pez cebra. La criocauterización del corazón causa la muerte masiva de células y la formación de tejido fibrótico, lo que reproduce parcialmente las consecuencias fisiopatológicas producidas por un infarto de miocardio en mamíferos. Pero a diferencia de los mamíferos, el pez cebra es capaz de eliminar estas lesiones masivas fibróticas del corazón y regenerar el tejido perdido.

El objetivo principal de este grupo de investigación es comprender la morfogénesis del epicardio y su papel como fuente de progenitores celulares y tejido señalizador en la regeneración y el desarrollo del miocardio y la vasculatura coronaria.



Foto: shutterstock

<https://www.cnic.es/es/desarrollo/pezcebra/>

M. Peralta, J.M. González-Rosa, I.J. Marques, and N. Mercader. **The Epicardium in the Embryonic and Adult Zebrafish**. *J Dev Biol*. 2014, 2(2):101-16. doi:10.3390/jdb2020101.

# Gen esencial para el desarrollo del corazón

Una reciente investigación, dirigida por Juan José Sanz Ezquerro del Centro Nacional de Biotecnología del CSIC, ha descubierto que el gen *Arid3b* (un factor de transcripción de funciones poco caracterizadas) desempeña un papel esencial en la formación del corazón en ratones y que podría tener un papel similar en humanos.

El corazón adulto está compuesto por cuatro cámaras separadas, dos aurículas y dos ventrículos, que bombean la sangre hacia los pulmones y el resto del cuerpo. Pero en su origen, "el corazón es un simple tubo que crece mediante la adición a sus extremos de nuevas células a partir de un reservorio de progenitores", afirma el científico. A día de hoy, se desconocen los mecanismos por los que esto ocurre.

« Los investigadores afirman que los embriones de ratones carentes de este gen mueren a etapas tempranas del desarrollo debido a graves defectos en el corazón »

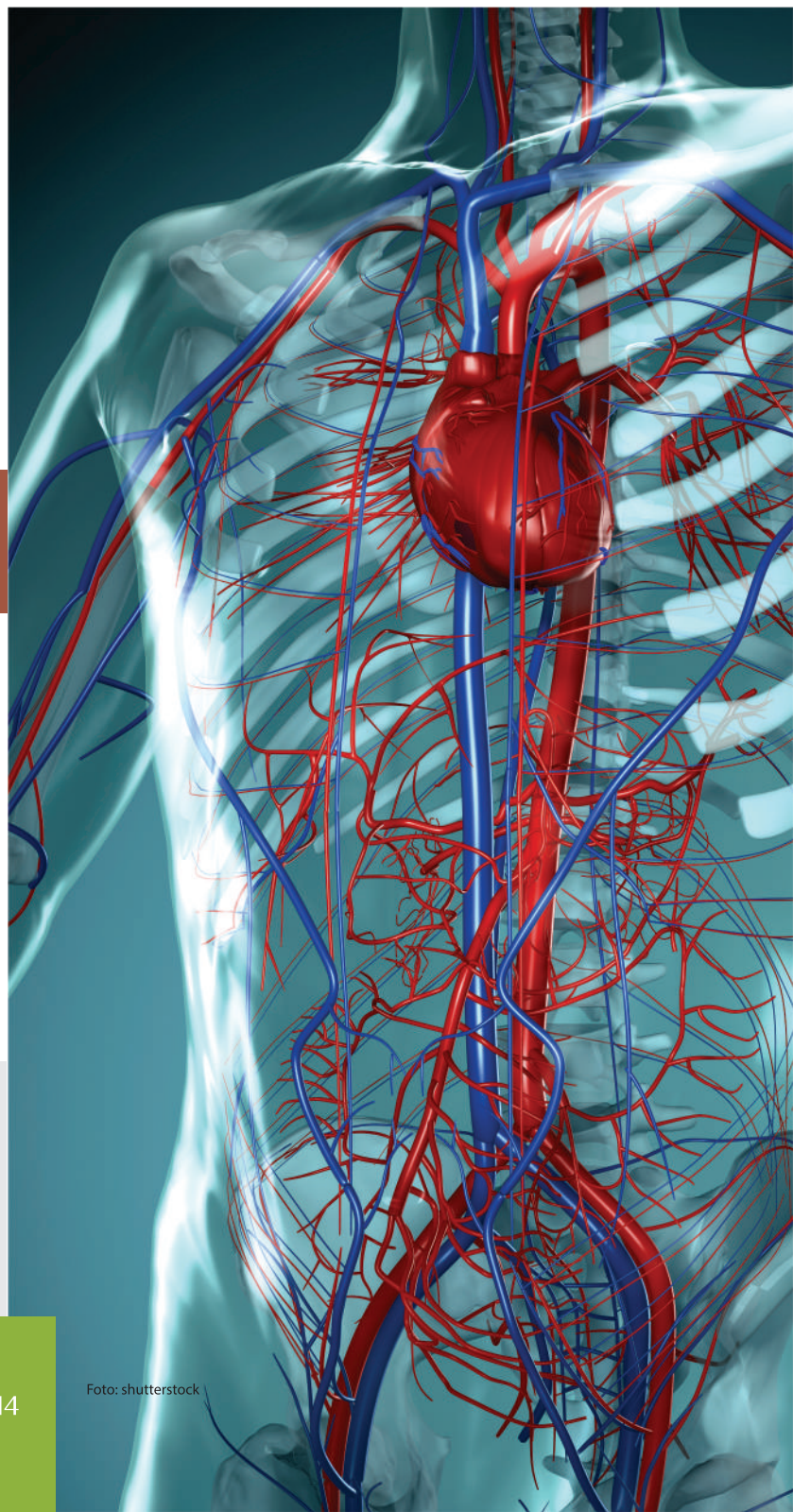
En estos ratones, la adición de los precursores al tubo cardíaco es anormal, provocando un acortamiento de los polos. Además, la formación de las válvulas cardíacas es defectuosa.

Los resultados obtenidos demuestran que *Arid3b* controla la arquitectura y el movimiento de las células progenitoras, y que es esencial para el desarrollo embrionario del corazón.

El trabajo publicado en la revista *Development*, amplía el conocimiento sobre las funciones del gen *Arid3b*, identificándolo como un posible gen implicado en las malformaciones del corazón en humanos y que afectan a un 1-2% de los recién nacidos.

<http://www.agenciasinc.es/Noticias/Descrito-un-gen-esencial-para-el-desarrollo-del-corazon>

V. Uribe, C. Badía-Careaga, J.C. Casanova, J.N. Domínguez, J.L. de la Pompa, and J.J. Sanz-Ezquerro. ***Arid3b is essential for second heart field cell deployment and heart patterning.*** *Development* 2014, 141(21): 4168-81. doi:10.1242/dev.109918.



## América del Sur en números

Las economías en expansión de América del Sur han dado lugar a un significativo aumento de la producción científica en las dos últimas décadas, y la inversión en investigación ha aumentado en la mayoría de países. Pero las tasas de publicación aún están lejos de lo que sería de esperar, dada la población de la región y su producto interior bruto (PIB).

La calidad de la investigación no se ha mantenido al ritmo del aumento de la producción, y los trabajos de investigación todavía luchan por atraer citas del resto del mundo. El continente ha aumentado su proporción de artículos de investigación en el mundo, pero su rendimiento es aún bajo.

Hay enormes desigualdades. Brasil domina el historial de publicaciones, a pesar de que es muy similar a la de Argentina, Uruguay y Chile en términos de artículos por habitante, mientras que Chile encabeza la lista en el entorno de las patentes y Argentina lidera en la proporción de la población que trabaja en ciencia, que ha aumentado el impacto de sus investigaciones a justo por encima de la media mundial, superando a Brasil.

« El impacto académico de América del Sur sigue siendo relativamente bajo, debido a que los investigadores a menudo publican en revistas que no están indexadas en las principales bases de datos de citas »

Los artículos procedentes de Perú están mejor situados, en gran parte porque la mayoría son en coautoría con otros países.

La inversión de Argentina y Brasil en investigación y desarrollo (I+D) se ha disparado más rápido de lo que han crecido sus economías. Brasil sigue siendo el único país de la región que dedica más del 1% de su economía a I+D.

<http://www.nature.com/news/the-impact-gap-south-america-by-the-numbers-1.15393>

R. Van Noorden. *The impact gap: South America by the numbers*. Nature 2014, 510(7504):202-3. doi:10.1038/510202a.



# La reproducción del Danio cebra en laboratorio

**Eduardo Díaz García**

Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC), Madrid

El danio cebra o cebrita *Danio rerio* (Hamilton, 1822) es un pez subtropical asiático que, desde su primera importación a Europa en 1905 por P. Matte en Lankwitz (Alemania), ganó en seguida popularidad como pez de acuario doméstico. No fue hasta bastante después que se describió su reproducción en cautividad. Pero desde que George Streisinger lo convirtió en modelo de investigación científica, los artículos que tratan de su reproducción se han multiplicado, sobre todo en los últimos años, causando, quizás, algo de confusión. Esta revisión pretende ser un compendio de lo que se sabe sobre la reproducción de estos animales, tanto en la naturaleza como en cautividad. Se explicarán las distintas alternativas, materiales, trucos y sugerencias para conseguir puestas en acuario. Los lectores que no deseen leer el artículo entero pueden acudir, como consulta rápida, directamente a la sección "Ejemplos concretos".

### La reproducción del Danio cebra en la naturaleza

El danio cebra es un ciprínido dulciacuícola asiático subtropical. Vive en el norte de la India y países adyacentes (Engeszer *et al.*, 2007; Spence *et al.*, 2006, 2008). Su hábitat predilecto son las masas de agua estancada, como lagunas, charcas, arrozales y canales asociados a éstos, aunque también puede encontrarse en ríos de corriente lenta (Spence *et al.*, 2006, 2008). Este animal vive en las orillas, en zonas de poca profundidad. Es principalmente insectívoro y se alimenta tanto de invertebrados adultos, terrestres y acuáticos, como de sus larvas (McClure *et al.*, 2006), aunque en análisis de contenido estomacal también se ha encontrado fitoplancton, plantas vasculares, esporas, escamas de pez, huevos de invertebrados, detritos, arena y barro (Spence *et al.*, 2008).

Para reproducir esta especie en cautividad, han de replicarse los estímulos desencadenantes del cortejo y puesta de huevos en la naturaleza.

Los danios cebra son animales sociales que viven en cardúmenes más bien laxos (Engeszer *et al.*, 2007). Las hembras, en especial, prefieren la compañía de machos que la de otras hembras (Delaney *et al.*, 2002). En la naturaleza se reproducen principalmente durante el monzón de verano (de junio a septiembre), aunque se han encontrado hembras con óvulos maduros en enero, así que se cree que la época de reproducción depende más de la disponibilidad de comida que de la estacionalidad (Spence *et al.*, 2006). El monzón de verano es la época de lluvias. Las nubes procedentes del océano Índico chocan contra las estribaciones meridionales del Himalaya y comienzan a ascender por esa rampa que son las vertientes montañosas. Al ganar altura, se enfrían, y como la concentración de agua evaporada que puede contener el aire es inversamente proporcional a su temperatura, llega un momento en que la nube ya no puede contener tanta agua, el sobrante se condensa y precipita en forma de lluvias, que caen sobre el Himalaya, encauzándose en sus ríos. Los ríos que nacen en el Himalaya desembocan en la India. Como las lluvias monzónicas son torrenciales, los cauces fluviales no pueden contener tanta agua y se desbordan. Los prados del norte de la India que bordean los ríos se inundan y las hierbas, que habitualmente crecen emergidas, pasan a vivir temporalmente sumergidas. Algunas especies de peces, entre las que se cuenta el danio cebra, salen entonces fuera del cauce del río y se van a reproducir a estos prados inundados (Engeszer *et al.*, 2007). Prefieren aparearse en las zonas más someras, justo al borde de la orilla. Los ejemplares que viven en zonas no inundables se reproducen también en las orillas, entre las plantas acuáticas o entre guijarros mejor que sobre barro. Un importante estímulo desencadenante del cortejo es la luz del amanecer. En la naturaleza, y casi siempre en cautividad, aunque no siempre, esta especie se aparea a primera hora de la mañana, o cuando se encienden las luces del acuario. En su hábitat natural se ha observado que las hembras pueden poner huevos por la tarde después de una lluvia fuerte (Spence *et al.*, 2006). El cortejo ya ha sido descrito (Darrow and Harris, 2004;

Hutter *et al.*, 2010). Recientemente, se ha descubierto que los machos poseen en la cara dorsal de los radios, de las aletas pectorales, unos tubérculos epidérmicos con los que se sujetan brevemente al vientre de las hembras y que son fundamentales en el apareamiento. Los machos a los que se les cortaron las aletas pectorales fueron incapaces de aparearse, aunque si se les cortaban todas las aletas menos las pectorales, sí podían hacerlo. Las hembras a las que se les cortaban las aletas pectorales sí podían aparearse (Kang *et al.*, 2013).

La fecundación es externa. Al ser cortejada por el macho, la hembra suelta un chorro de óvulos que caen por gravedad al fondo y quedan ocultos entre las plantas acuáticas y la arena. Mientras se precipitan, el macho nada entre ellos describiendo trayectorias en forma de ocho, a la vez que eyacula. Cuando desencadena este comportamiento, tiene inhibido el instinto de alimentación (observación personal); si no fuera así, devoraría los óvulos, ya que esta especie es oófaga. Los huevos permanecen ocultos en el fondo, a salvo de la voracidad de sus propios padres y otros depredadores, durante 2 días, al cabo de los cuales nacen las larvas. Asimismo, éstas permanecen ocultas en el fondo o pegadas a las plantas acuáticas durante 2 ó 3 días más, alimentándose del vitelo. A medida que crecen, se adhieren a superficies cada vez más altas, hasta que al 4º ó 5º día de vida, dependiendo de la temperatura del agua, alcanzan la superficie de la misma, llenan la vejiga gaseosa con aire atmosférico (Goolish and Okutake, 1999) y empiezan ya a nadar y a alimentarse de cualquier protozoo que puedan tragar entero.

### La reproducción del Danio cebra en cautividad

Como hemos señalado antes, para reproducir esta especie en nuestros animalarios debemos recrear lo que se ha observado en la naturaleza.

Podemos dividir las técnicas de reproducción en cautiverio en dos tipos: técnicas de reproducción *ex situ* y técnicas de reproducción *in situ*.

#### Reproducción *ex situ*

Lo habitual es reproducir esta especie en peceras de reproducción distintas a las peceras de estabulación. Estos animales pueden reproducirse en parejas, en tríos de un macho y dos hembras, o una hembra y dos machos, o en grupo. Los cuartetos de un macho y tres hembras o tres machos y una

hembra no suelen dar resultado, aunque en algunas ocasiones puedan hacerlo (observación personal).

La frecuencia de reproducción usando esta técnica debería ser, como mucho, de una vez a la semana para el mismo ejemplar. Si después de varias semanas éste deja de reproducirse, debe dársele un descanso de 2 o 3 semanas para que se recupere.

Las peceras de reproducción son de tamaño pequeño (aproximadamente de 1 o 2 litros de capacidad) para una pareja o un trío, o mayores para grupos. Como esta especie es oófaga, siempre deben tener un doble fondo. El fondo superior consiste en una rejilla, o una placa horadada, que deja pasar los huevos al fondo inferior, en el que quedan a salvo de la voracidad de sus padres (ver Figura 1).

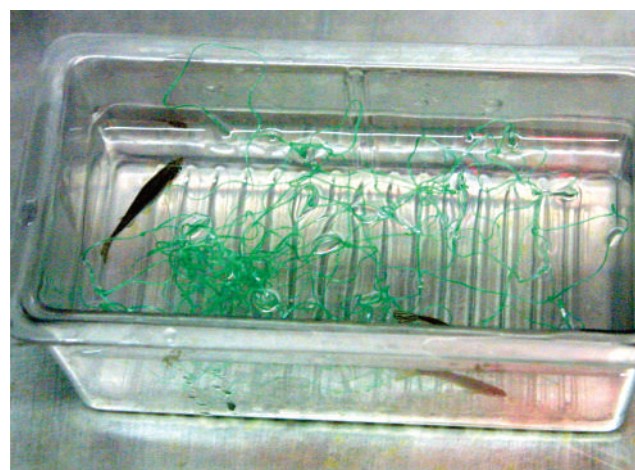


Figura 1.

Estas peceras son de plástico transparente, pero debe tenerse en cuenta que, tal y como demostraron Jacobo Cela, Juan Ramos y Juan Martín en un póster presentado en el congreso de la SECAL (2009), los danios cebra prefieren desovar sobre un fondo oscuro a uno claro. Pueden colocarse las peceras sobre una mesa oscura.

Una alternativa muy popular hace años, pero ya pasada de moda, consiste en llenar el fondo de un acuario con canicas y cubrirlo con unos centímetros de agua. Las canicas mimetizan los guijarros de un río. Los huevos quedan ocultos en los huecos entre las canicas y así los padres no pueden comérselos (Westerfield, 1995). Para recoger los huevos, hay que sacar las canicas, lo que dificulta la tarea; resultan preferibles las peceras con doble fondo.

Como estos peces se aparean por la mañana, cuando se encienden las luces del acuario, se traslada a los reproductores de sus peceras de estabulación a las de reproducción el día anterior por la tarde, por lo que han de pasar toda la noche en las mismas. Puesto que estas peceras de reproducción carecen de filtro y el volumen de agua es muy pequeño, se corre el riesgo de que el amoniaco que excretan los animales se acumule en exceso y produzca una intoxicación. Para evitarlo, sólo se deja en estas peceras a los reproductores desde la tarde anterior al día de la puesta hasta después de la misma. Entonces, debe devolverse a las peceras de estabulación. Nunca se los deja en ellas más de un día y no se los alimenta mientras permanezcan en las mismas.

En caso de que se necesiten embriones en un estadio de desarrollo muy concreto (por ejemplo, para microinyección de embriones), es necesario mantener separados al macho y a la hembra en la pecera de reproducción hasta el momento deseado. Para ello, las peceras de reproducción comerciales incorporan en su parte media una ranura en la que se puede insertar una placa transparente de quita y pon, que las divide de dos mitades (ver Figura 2). En una mitad se pone al macho y en la otra a la hembra. De esta forma, pueden verse y olerse, pero no tocarse. Cuando se desee que los peces empiecen a aparearse, basta con retirar la placa separadora.

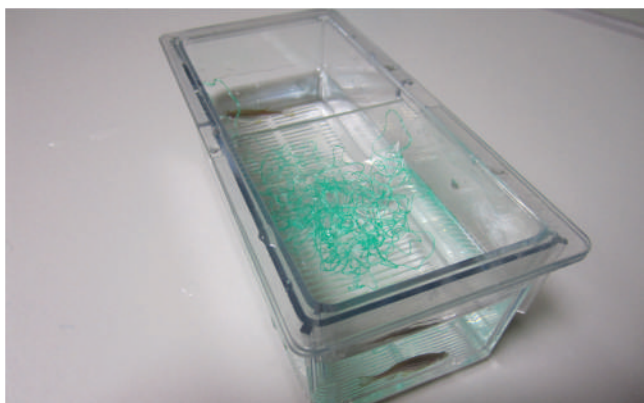


Figura 2.

Hemos de advertir que en un par de ocasiones algunos de nuestros peces se las arreglaron para aparearse con placa separadora de por medio. Esto es excepcional (y muy notorio).

En principio, lo único que se necesita para que una pareja se reproduzca es poner juntos al macho y a la hembra en estas peceras de reproducción por la tarde y dejarlos tranquilos hasta la

mañana siguiente. La tranquilidad es muy importante, ya que aunque esta especie tolera cierto movimiento de personal alrededor, no se aparearán si hay excesivo barullo en torno a la pecera (observación personal).

Ahora bien, hay una serie de técnicas de enriquecimiento ambiental que estimulan la reproducción de esta especie, así que si las tomamos por norma, conseguiremos mejores puestas. Estas técnicas de enriquecimiento son especialmente importantes con aquellos ejemplares en cuyas peceras de reproducción se han colocado placas separadoras. El hecho de que los animales no puedan reproducirse a la hora que deseen, sino a la que deseemos nosotros, suele conllevar peores puestas que en aquellos ejemplares que se han dejado juntos sin placa separadora.

La técnica de enriquecimiento ambiental más habitual consiste en colocar en las peceras de reproducción unas fibras artificiales, que imitan las plantas acuáticas de las orillas de los ríos y lagunas en las que viven estos peces, o la hierba sumergida de los prados inundados (ver Figura 3). No obstante, pese a la popularidad del método, aconsejado en todos los libros, al parecer lógico, intuitivo y, por qué no, una pizca romántico, nosotros no hemos detectado ninguna correlación entre su empleo y el éxito de puesta. Por ejemplo, en 123 cruces - realizados en distintos días, de líneas silvestres, transgénicas y mutantes, agrupando los reproductores en parejas, en tríos de dos machos y una hembra, y de un macho y dos hembras, con placa separadora y sin ella, usando peceras de reproducción *ex situ* de 1 litro del modelo comercializado por Aquaneering - el éxito de puesta fue *siempre* similar tanto en peceras con plantas acuáticas artificiales, como en peceras sin ellas. En total, de 62 peceras con plantas acuáticas artificiales, pusieron 30 (48.38%) y de 61 peceras sin plantas acuáticas artificiales, pusieron también 30 (49.18%).



Figura 3.

Si se reprodujera un grupo de peces en una pecera grande y desnuda, sí podría ser lógico que los animales escogieran las plantas acuáticas para reproducirse, al constituir éstas el único punto focal en ese mundo desnudo y transparente. Algo similar a cuando los roedores escogen la esquina de la jaula para marcar el territorio o esconder alimento.

Si se emplean plantas acuáticas artificiales, conviene tener en el acuario un recipiente lleno de desinfectante (como el que se emplea para desinfectar material de laboratorio) o agua con lejía, en el que se sumerja esta fibra artificial, o cualquier otro material que haya entrado en contacto con el agua (como los salabres), para desinfectarlo y poder volver a usarlo, tras haberlo aclarado muy bien en agua del grifo, sin riesgo de transmisión de patógenos de unas peceras a otras.

Una técnica tradicional en acuarística clásica, que a nosotros nos da excelentes resultados, consiste en alimentar en abundancia a los reproductores a lo largo de todo el día anterior a la puesta (es decir, a lo largo del mismo día en que se los va a cruzar por la tarde para que pongan a la mañana siguiente), preferentemente con alimento vivo, o congelado. Nosotros usamos los mismos nauplios de artemia con los que alimentamos a los alevines, o bien artemia adulta congelada, o larvas rojas de mosquito congeladas, o una combinación de nauplios de artemia vivos y comida congelada (pero alternándolas). El alimento congelado se les debe dar en porciones pequeñas varias veces a lo largo de todo el día, ya que si se les da en porciones grandes en 1 o 2 tomas, los peces sólo comerán hasta que se llenen, dejando entonces de alimentarse, y pudriéndose los restos sin devorar en el agua. En cambio, en el caso de alimentarlos con nauplios de artemia vivos, lo que da mejor resultado consiste en dárselos varias veces a lo largo del día, y en cantidad suficiente para que se forme una nubecilla de nauplios que rodee a los peces y así éstos tarden más en devorarlos.

Otra técnica tradicional en acuarística clásica consiste en añadir un chorro de agua fría al acuario de reproducción cuando se quiera que los animales empiecen a aparearse (por ejemplo, tras retirar la placa separadora). Se supone que el descenso repentino en la temperatura del agua mimetiza el efecto del aporte de agua fría de la montaña, procedente del Himalaya, que se produce en los ríos indios durante el monzón de verano. Nosotros usamos esta técnica durante varios años, pero ya la hemos abandonado al no observar ninguna correlación entre su empleo y el éxito de puesta.

Aunque se insista normalmente en que estos peces se aparean sólo tras la salida del sol, en cautividad es posible conseguir puestas más tardías. Algunas parejas se hacen las remolonas y no empiezan a aparearse hasta 2 o 3 horas tras el encendido de las luces. En una sesión de microinyección es posible conseguir huevos incluso a la 1 de la tarde (si las luces se encienden a las 8 o 9 de la mañana). En una ocasión, parejas de peces que llevaban desde la tarde anterior en peceras de reproducción *ex situ* con placa separadora (Figura 2), se reprodujeron al retirarles la placa separadora a las 3 de la tarde (hora de encendido de las luces: 8 de la mañana).

Si tras retirar la placa separadora no se aprecia cortejo, eso no significa necesariamente que esos peces no vayan a poner ese día. Puede que empiecen a poner tras 1 hora o más. Personalmente, hemos observado que es más probable que los peces empiecen a reproducirse inmediatamente tras retirar la placa separadora si hay 2 machos por hembra. Asimismo, es más probable que los mismos ejemplares pongan 2 o 3 veces a lo largo de una mañana si están en pareja. Si están en tríos de 2 machos y 1 hembra, da la impresión de que el doble de estimulación en el cortejo induce a la hembra a poner todos sus huevos de inmediato, mientras que si se encuentran acompañadas por 1 solo macho, la estimulación que reciben es menor, pueden tardar más en empezar a poner huevos y lo hacen en varias tandas, de forma más pausada, pero más prolongada en el tiempo.

Naturalmente, para que haya puesta primero tiene que haber cortejo. Si el macho no corteja a la hembra, ésta no pondrá huevos. Pero es bastante frecuente que el macho siga cortejando a la hembra cuando ésta ya ha puesto todos los huevos. Si es el caso y en otra pecera tenemos un macho que se muestra indiferente y no está cortejando a su hembra, podemos trasladar al macho que aún corteja a esta otra pecera (sin necesidad de retirar al macho indiferente que ya había). Haciéndolo así, es muy probable que esta hembra también ponga huevos.

¿Y si lo que necesitamos son miles de huevos puestos simultáneamente? Hacerlo mediante el sistema clásico que hemos explicado sería muy costoso en tiempo y espacio. Para casos así, la empresa Tecniplast comercializa un acuario de reproducción llamado iSPAWN (ver Figura 4; Adatto *et al.*, 2011). Consiste en un gran recipiente, con una capacidad de 100 litros, independiente de los acuarios de estabulación, que se puede apoyar en el suelo sobre cuatro patas. Está dividido en tres componentes: la cámara externa, la plataforma de puesta y el

separador. La tarde anterior al día de la puesta, se llena la cámara externa de agua y se mete dentro la plataforma de puesta, empujándola hasta el fondo. Ésta consiste en un recipiente con un fondo de rejilla ondulado. La distancia entre la cresta de las ondulaciones y los valles es de 12.7 mm. Luego se echan las hembras en el recipiente. Tras eso, se añade el tercer componente, el separador: una rejilla horizontal que se coloca sobre las hembras, por lo que éstas quedan nadando en la mitad inferior del iSPAWN. Sobre el separador se echan los machos (que quedan nadando en la mitad superior). El número máximo de ejemplares que debe añadirse es de 250 (porque si la densidad es de más de 2.5 ejemplares por litro, las puestas no son tan buenas), echando más machos que hembras para mejorar la fecundación de los huevos. A la mañana siguiente, se retira el separador para juntar ambos sexos y se eleva la plataforma de puesta hasta que las crestas del fondo de rejilla quedan a ras del agua y los valles a tan sólo 12.7 mm de profundidad. Esto desencadena de inmediato una suerte de orgía piscícola a lo romano y los huevos caen «como copos de nieve» (sic), atravesando la rejilla de la plataforma, hasta el fondo de la cámara externa, que tiene forma de embudo. Abriendo una llave inferior, se recogen fácilmente. En los experimentos de prueba, dejaban a los peces aparearse durante 10 minutos, así se aseguraban que todos los embriones estaban en el mismo estadio. Las cifras que dan oscilan entre 6800 y 8600 huevos puestos en esos 10 minutos.



Figura 4.

Lo que no mencionan es que luego hay que separar los machos de las hembras; y si son 250 ejemplares, aconsejo ayuda si uno no tiene la expectativa profesional de vender el cupón.

### Reproducción *in situ*

Una alternativa al apareamiento en peceras de reproducción consiste en el apareamiento en la propia pecera de estabulación.

Esto tiene varias ventajas. La primera es de orden práctico: se emplea menos tiempo reproduciendo los peces en la propia pecera de estabulación que en peceras de reproducción. La segunda consiste en que de esta forma se pueden conseguir puestas más frecuentes que las semanales típicas de la reproducción *ex situ*. En un artículo clásico (Eaton and Farley, 1974a) se afirma que hembras de 12 meses de edad ponían huevos con una frecuencia de 1.9 días (con una media de 23.1 huevos por pareja), disminuyendo a 2.7 días después de 3 meses (con una media de 60.4 huevos por pareja).

Si en lugar de tener una pareja por acuario se tiene un grupo de varios machos y hembras, se consiguen puestas diarias porque en distintos días se reproducen distintos ejemplares.

Un sistema tradicional de reproducción *in situ* no es sino una variante de la técnica de las canicas que se explicó anteriormente, y consiste en llenar una placa de Petri de canicas y colocarla en el fondo de la pecera de estabulación. Los peces escogerán ese lugar para poner los huevos. Hay que tener en cuenta que si un ejemplar territorial hace suya la placa, impedirá que el resto de ejemplares del mismo sexo se apareen (véase más adelante).

La empresa Aquatic Habitats ha diseñado dos sistemas de reproducción *in situ*. El Breeder Tank Insert (ver Figura 5) consiste en un pequeño recipiente provisto de una ventosa, que se puede pegar a la altura que se desee en las paredes internas del acuario de estabulación. Este modelo tiene por tapadera una rejilla de quita y pon. Los huevos la atraviesan y van a parar al interior del recipiente, donde quedan a salvo de la voracidad de sus padres. Sobre esta rejilla se pueden colocar fibras artificiales para imitar las plantas acuáticas. Cuando se pega a las paredes internas del acuario de estabulación, este ponedero queda ya en una posición naturalmente inclinada, así que se puede colocar de forma que el borde superior coincida con el nivel del agua (ver Figura 6).

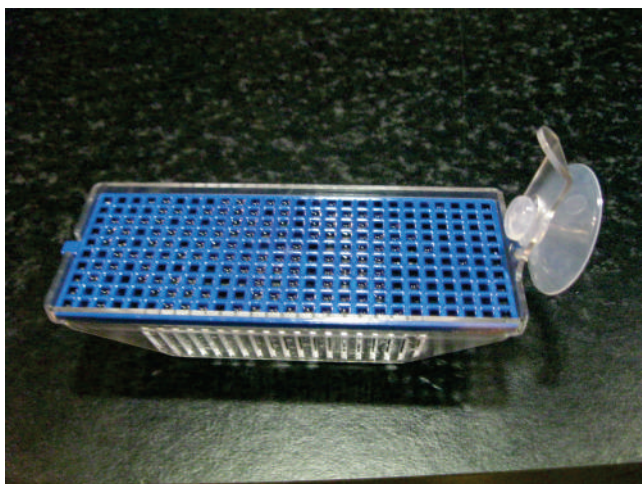


Figura 5.

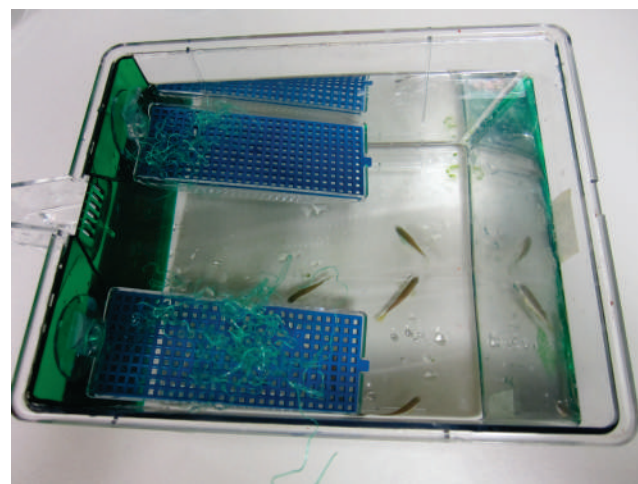


Figura 7.



Figura 6.

Se consiguen mejores resultados si se introducen 2 o más unidades dentro de la pecera de estabulación (observación personal, ver Figura 7). Esto es coherente con la teoría de que algunos ejemplares se vuelven transitoriamente territoriales durante la reproducción, tanto machos (Spence and Smith, 2005), como hembras (Gerlach, 2006; véase más adelante). Un individuo territorial hará suyo el ponadero e impedirá que otros ejemplares del mismo sexo se apareen. Por ello, la colocación de 2 o más unidades incrementa notablemente el número de huevos. Nosotros no hemos encontrado ninguna correlación entre el empleo de plantas acuáticas artificiales y el éxito de puesta en este tipo de ponaderos.

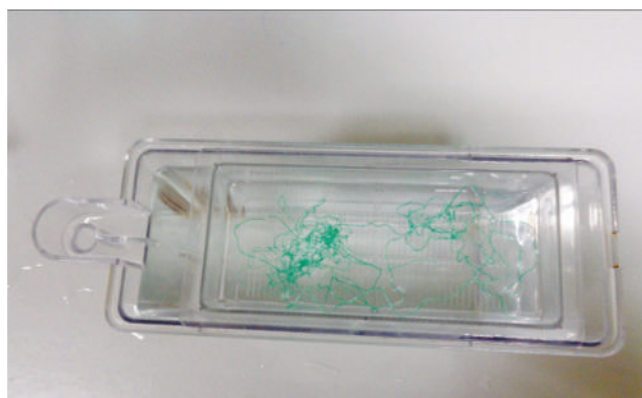
Con este modelo de ponadero pueden conseguirse puestas tanto si se introduce dentro del acuario de estabulación la tarde anterior a la mañana de la puesta, como si se introduce la misma mañana de la puesta (observación personal). Esto último no puede darse por seguro, pero es muy frecuente<sup>1</sup>.

Hay que tener en cuenta que usando este método perdemos control sobre la hora de la puesta (a no ser que introduzcamos el ponadero por la mañana y lo saquemos un rato más tarde, cuando veamos que ya hay huevos) y la paternidad de la descendencia (a no ser que en la pecera de estabulación haya sólo una pareja de peces o un trío en el que el pez que tenga importancia sea el de sexo unitario).

El Breeder Tank Insert sólo tiene dos problemas. El primero consiste en que, al estar dentro de las peceras de estabulación, puede ensuciarse de restos de comida, por lo que es necesario sacarlo y lavarlos diariamente, incluso aunque los peces no hayan puesto huevos ese día (nótese en las Figuras 6 y 7 que los tanques están pegados a la pared trasera de la pecera de estabulación, ya que se alimenta a los animales por la parte delantera y así hay menos probabilidad de que caigan dentro de los mismos restos de comida). El segundo consiste en que la ventosa, a fuerza de usarla, acaba perdiendo adherencia y es necesario reemplazarla. Aquatic Habitats vende ventosas de reemplazo.

<sup>1</sup>En una ocasión, unos peces se aparearon a las 3 y media de la tarde en una de estas peceras, que yo había colocado hacia las 12 y media o la 1 de la tarde.

Una alternativa casera a este modelo consiste en colocar la parte superior de fondo horadado de las peceras de reproducción *ex situ* dentro de las peceras de estabulación, apoyando los bordes superiores de las primeras sobre los de las segundas, y mantener ahí los peces indefinidamente junto con plantas acuáticas artificiales (ver Figura 8; Gonsar *et al.*, 2012). El sistema de circulación del agua permanece abierto y se puede alimentar a los animales de forma normal. Cuando éstos se aparean, los huevos atraviesan el fondo horadado de las peceras de reproducción y caen al fondo de las peceras de estabulación, de donde se pueden recoger simplemente sifonándolos. Si se adopta este sistema, hay que elegir peceras de reproducción de al menos 2 litros, porque en el modelo habitual de 1 litro de capacidad los peces están demasiado constreñidos. Un inconveniente que vemos a este sistema es que para recoger los huevos del fondo de la pecera de estabulación hay que sacar la parte superior de la pecera de reproducción, junto con los peces, y colocarlo todo provisionalmente en un recipiente lleno de agua. Una vez recogidos los huevos, se vuelve a pasar la parte superior de la pecera de reproducción, junto con los peces, a su lugar original hasta el día siguiente.



**Figura 8.**

El otro modelo de Aquatic Habitats recibe el nombre de Mass Embryo Production System o MEPS (ver Figura 9). Consiste en un acuario cilíndrico y opaco construido en dos tamaños, con capacidades de 80 y 242 litros respectivamente, que dispone de su propio filtro e iluminación, y que se puede conectar a la circulación de agua de un acuario típico con estantes, o funcionar como un sistema de circulación abierto. En él pueden mantenerse los peces permanentemente (hasta 2000 ejemplares en el modelo de 242 litros y 660 en el de 80 litros). En ambos modelos, puede colocarse una o más plataformas de reproducción, consistentes

en embudos con una rejilla en su parte superior. Estas plataformas de reproducción se pueden ubicar a distintas profundidades y decorarse con plantas acuáticas artificiales. Cuando los peces desovan sobre estas plataformas, los huevos atraviesan la rejilla y son conducidos por el embudo a un tubo unido a él en el que se bombea aire, que lleva los huevos a un colector, desde el que se pueden recoger fácilmente sin molestar a los peces (Harper *et al.*, 2011).



**Figura 9.**

El hecho de que este acuario tenga su propio sistema de iluminación (de encendido y apagado progresivos) y sea opaco significa que se puede programar para que tenga un ciclo lumínico distinto al del resto de peceras del acuario y conseguir así grandes puestas (de decenas de miles de huevos) a la hora que se prefiera<sup>2</sup>.

<sup>2</sup>Yo no tengo experiencia con este sistema, pero me pregunto: en caso de que esté aislado de la circulación del agua del acuario y sea, por tanto, un sistema de circulación cerrado, ¿verdaderamente deben mantenerse indefinidamente 2000 peces en 242 litros?

La empresa Aquaneering ha construido un sistema similar a éste. Se trata del AquaSpawner 100 (ver Figura 10). También consiste en un cilindro opaco, con tapadera e iluminación propias para independizarse del ciclo lumínico del acuario general. La cubeta tiene 100 litros de capacidad, puede conectarse al sistema de circulación del agua del acuario general o disponer de filtro propio. Puede albergar indefinidamente hasta 1500 peces. Los ponederos consisten en hasta 3 bandejas que tienen por tapadera una rejilla azul sobre la que pueden anclarse plantas acuáticas artificiales. Estas bandejas se ubican en el momento en el que se deseen puestas, inclinadas y con el borde superior a ras del agua. Si se necesitan huevos de un estadio concreto, se pueden colocar las bandejas, dejarlas unos minutos, sacarlas de sus soportes y sustituirlas por otras nuevas mientras se recogen los huevos que haya en las primeras.

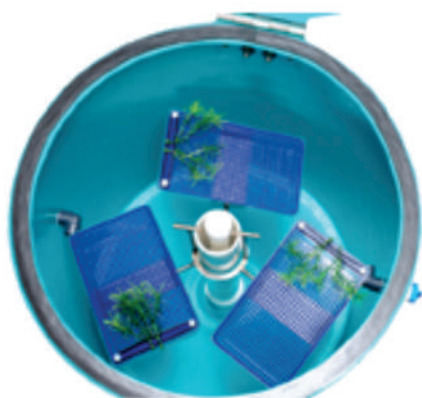


Figura 10.

Experimentos:

Uno de los primeros experimentos científicos relativos a la reproducción en cautividad de esta especie se llevó a cabo allá por las postrimerías de los años 50. Ngawang Gonsar y sus colaboradores afirman que Roméo Legault publicó en 1958 que si se mantiene a estos animales a 26°C, ponen cada 5 días; mientras que si se aumenta la temperatura a 30°C, ponen cada 2 días (Gonsar *et al.*, 2012); pero es mentira. Lo cierto es que el experimento consistió en un control de la hora de las puestas, retrasando artificialmente el «amanecer». Legault mantenía entre 48 y 60 ejemplares adultos en un acuario de 58x29x29 cm, con un ratio de 2 machos por hembra. Un cartón oscuro tapaba las paredes laterales y trasera del acuario, y sólo la pared frontal y el techo eran transparentes. La «noche» se conseguía tapando el techo y el frontal, y el «amanecer», retirándolos. Haciéndolo así,

lograba puestas, casi todos los días, de entre 50 y 100 huevos. Consiguió que los peces pusieran incluso a las 2 de la tarde, cuando lo normal es que lo hubieran hecho entre las 7 y las 8 de la mañana. Este acuario tenía en su parte media un cristal vertical separador, pegado al fondo y de unos 12 cm de altura, que lo dividía longitudinalmente en dos partes. La mitad trasera se llenaba hasta el borde (los 12 cm de altura) de arena clara. Ahí se podían anclar plantas acuáticas. El fondo de la mitad anterior se cubría de canicas. Los peces ponían siempre en el fondo de canicas, no en la mitad cubierta de arena clara aunque fuese más somera (ver Figura 11; Legault, 1958).

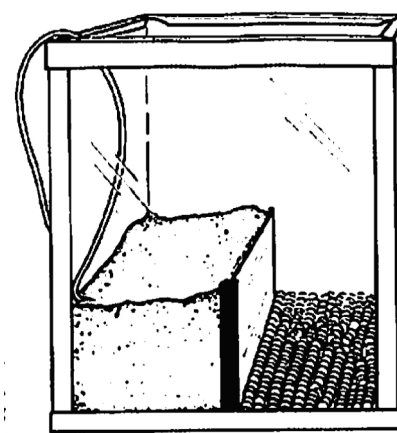


Figura 11.

Exactamente ese mismo modelo de acuario, con las mismas medidas y todo, es el que describe 10 años más tarde Wolfgang Wickler en su clásico *La Cría de los Peces de Acuario*, salvo que, seguramente por motivos estéticos, sustituye las canicas por guijarros (Wickler, 1968).

En 1974, se dejaron juntas permanentemente parejas de estos peces, de 12 meses de edad, y se concluyó que ponían con una periodicidad media de 1.9 días, demorándose a 2.7 días tres meses después. La temperatura del agua oscilaba entre 25 y 27°C. El mantenimiento de estos animales en agua dura o en grupos de 3 machos y 1 hembra no influía en este ciclo. También se probó a separar ambos sexos durante periodos al azar, de entre 2 y 9 días, y reproducirlos después, pero se conseguían mejores puestas manteniéndolos siempre juntos. Además, fue imposible conseguir huevos viables intentando extraerlos manualmente (véase más adelante), si el macho no estaba presente desde, al menos, 7 horas antes del momento de la extracción (Eaton and Farley, 1974a).

Estos mismos autores, en otro artículo publicado ese mismo año, afirman que esta especie empieza a poner cuando los machos alcanzan una longitud de 23.1 mm y las hembras de 24.9 mm (Eaton and Farley, 1974b).

Un año más tarde, se estudiaron distintos estímulos que desencadenaban la ovulación de esta especie y se compararon los resultados (Chen and Martinich, 1975). Los estímulos fueron: presencia de feromonas secretadas por los machos, choque térmico (pasando las hembras de un acuario de estabulación a 27°C a uno de puesta, experimental, a 21°C), ausencia de metabolitos generados por otros danios cebr de ambos sexos, presencia visual (pero no química) de un macho y estimulación auditiva o de la línea lateral. Los resultados son un poco confusos. Parece claro que la ausencia de metabolitos de otros peces es un factor muy importante, y que sólo la visión de un macho, o la estimulación auditiva, o de la línea lateral no influyen en absoluto. Pero mientras que en la tabla que se incluye en el artículo, el choque térmico aparece como un estímulo muy importante y la presencia de feromonas secretadas por los machos sólo influye en la mitad de los experimentos, en los resultados y la discusión ¡estos autores afirman justamente lo contrario! Seguramente, hubo una errata en la elaboración de la tabla.

Frecuentemente se dice que esta especie se aparea en grupos, pero Sophie Hutter (Hutter *et al.*, 2010) afirma que esto sólo ocurre en peceras pequeñas con una densidad de población muy alta, mientras que en peceras grandes (1100 litros) y con baja densidad de población, prefieren aparearse en parejas. Además, ha observado selección sexual<sup>3</sup>.

Aunque esta especie no es territorial en sentido típico, es decir, no forma territorios alimentarios permanentes, se ha descrito que algunos machos pueden ser transitoriamente territoriales en la zona de reproducción (Spence and Smith, 2005). Defienden una pequeña parcela, similar a las arenas de los combatientes o los urogallos, en la que no dejan entrar a otros machos, sólo mientras se están reproduciendo. Esto no lo hacen todos los machos (los que no lo hacen, persiguen a las hembras) y Sophie Hutter (Hutter *et al.*, 2010) afirma que este comportamiento es muy raro en peces mantenidos en peceras

grandes, por lo que podría ser un artefacto producto de las condiciones ambientales. Sin embargo, Spence ha observado este mismo fenómeno en peces mantenidos a baja densidad (Spence *et al.*, 2006), concluyendo que a baja densidad la paternidad de los embriones favorece a los individuos territoriales, pero que a alta densidad no se nota diferencia entre unos y otros (en su artículo no deja claro cómo distinguió a los individuos territoriales de los no territoriales en los experimentos a alta densidad). Por su parte, Gabriele Gerlach (Gerlach, 2006) afirma que algunas hembras también forman territorios similares.

Y ya que hablamos de densidades, en un experimento multitudinario e internacional en el que también participaron españoles (Castranova *et al.*, 2011) se concluyó que no se observan diferencias en el rendimiento de las puestas, ni en la supervivencia de los embriones si se mantiene a los padres en densidades que van desde los 3 peces por litro a los 12 peces por litro. Hay que tener en cuenta que los peces se mantenían en peceras colocadas en estantes y conectadas a un sistema general de circulación semiabierto (el agua circula continuamente entre las peceras y el filtro, y todos los días se cambia una parte por agua nueva). Como, además del agua de las peceras, hay que contar el agua de los filtros y de las tuberías, los peces disponen, en realidad, de más volumen de agua circulando continuamente entre la pecera y el filtro que el de la pecera en sí. O sea, el resultado de este experimento no vale como excusa para mantener densidades de 12 peces adultos por litro en acuarios aislados (como un acuario casero), sino para aprovechar mejor el espacio en sistemas de estanterías conectadas a un filtro central. Además, el experimento se centra sólo en los resultados de la puesta y no analiza si se produce algún efecto fisiológico debido al estrés al mantener a largo plazo, a los animales en densidades tan altas. Nosotros hemos observado una mayor incidencia de peces enfermos si se mantienen en alta densidad durante periodos prolongados.

Por otro lado, Rowena Spence (Spence and Smith, 2006) asegura que los machos forman jerarquías, pero que las hembras no prefieren aparearse con machos jerárquicamente dominantes<sup>4</sup>. Una hembra puede aparearse con un macho agresivo simplemente porque éste ahuyente a los otros machos, no porque le atraiga especialmente. Lo mismo puede decirse de los machos territoriales (Spence *et al.*, 2008).

<sup>3</sup>El único inconveniente que encuentro a este artículo es que, aunque pretendían ofrecer a sus peces (descendientes de ejemplares capturados en la naturaleza) un ambiente natural, lo cierto es que sus acuarios tenían una profundidad uniforme de 80 cm, muy alejada de la elegida por esta especie en la naturaleza para aparearse.

<sup>4</sup>Ahora bien, Spence parece tener ideas propias acerca de lo que es una jerarquía; término, por otra parte, que muchos investigadores confunden, ya que llaman «jerarquía» a lo que Dios les da a entender. En mi opinión, los resultados de Spence se

En otro experimento (Watt *et al.*, 2011), se cruzaron a la vez dos machos con una hembra. Uno de los machos se consideraba dominante (en realidad, era simplemente más agresivo que su compañero) y el otro, subordinado. Al hacer un análisis de paternidad, se comprobó que si ambos machos eran más o menos del mismo tamaño, la mayor parte de los alevines eran hijos del macho dominante; pero que si el subordinado era más pequeño que su compañero, él era el padre de la mayoría de los alevines. Esto se achacó a una mayor agilidad del pequeño frente al grande.

En cuanto a la relación de tamaño de los reproductores, los estudios son un poco confusos. Mientras que M. Pyron (Pyron, 2003) afirma que las hembras prefieren aparearse con machos grandes y que a los machos no les importa el tamaño de las hembras, Sophie Hutter (Hutter *et al.*, 2010) afirma ¡justo todo lo contrario!, argumentando que los resultados de Pyron son un artefacto, resultado de las condiciones ambientales en las que este autor mantenía a sus peces. Nuestra experiencia personal es que los mejores resultados se consiguen cuando el tamaño de los ejemplares reproductores es parecido, tanto si son dos ejemplares de tamaño pequeño, mediano o grande.

Una disparidad de tamaño entre el macho y la hembra no impide la reproducción, pero sí la dificulta. El número de huevos depende del tamaño de la hembra. Las hembras grandes ponen más huevos que las hembras pequeñas. Como estos peces crecen durante toda su vida, las hembras son más grandes cuanto más viejas. Como se ha comentado anteriormente, se ha observado que empiezan a poner cuando alcanzan una longitud estándar (medida desde el hocico hasta la base de la aleta caudal) de 24.9 mm las hembras y 23.1 mm los machos (Eaton and Farley, 1974b).

---

deben a que, en realidad, ella no observó ninguna jerarquía. Simplemente llama «dominantes» a los machos que establecen territorios transitorios de reproducción y «subordinados» a los que no lo hacen. El concepto de jerarquía de Gabriele Gerlach (Gerlach, 2006) y el de Gregory Paull (Paull *et al.*, 2010) son similares al de Spence. Pero ser territorial no significa ser jerárquicamente dominante. Es lógico que un animal que establece un territorio lo defiende agresivamente y no permita el paso de otros individuos de la misma especie, sin que eso implique ninguna relación de jerarquía entre ellos. En cuanto a Earl Larson (Larson *et al.*, 2006) y Watt (Watt *et al.*, 2011), llaman jerarquía a un fenómeno que se explicará más adelante, consistente en que cuando se ponen dos machos juntos en una pecera, suele ocurrir que el más agresivo acose al menos agresivo y acabe arrinconándolo contra una esquina de la pecera. Yo dudo que el danio cebra forme jerarquías, y creo que para afirmar tal cosa se necesitan estudios más rigurosos que los que se han hecho hasta el momento y menos influencia de los documentales de la televisión, que parecen dar a entender que cualquier especie animal que viva en grupos ha de formar forzosamente jerarquías (para más información sobre este tema, puede consultarse Drews, 1993).

Con esa longitud, ponen pocos huevos. Esta longitud suele alcanzarse hacia el 3º o 4º mes de vida en cautividad, pero en la naturaleza el comienzo de la madurez sexual puede demorarse hasta el 5º o 6º mes de vida (Engeszer *et al.*, 2007)<sup>5</sup>. En un experimento hecho con hembras de distinto tamaño pero misma edad (Uusi-Heikkilä *et al.*, 2010), se comprobó que las hembras grandes ponían más frecuentemente y mayor cantidad de huevos que las hembras pequeñas; además, sus embriones sobrevivían mejor que los de las hembras pequeñas. Los huevos de las hembras pequeñas eran mayores en diámetro que los de las hembras grandes, pero el tamaño del embrión y del vitelo no difería. Los huevos puestos por hembras grandes eclosionaban antes que los puestos por hembras pequeñas, y aunque la longitud de los embriones no difería, el volumen corporal de los hijos de hembras grandes era mayor que el de los hijos de hembras pequeñas, así como también era mayor el tamaño del saco vitelino de los embriones hijos de hembras grandes que el de los hijos de hembras pequeñas.

Según Gabriele Gerlach (Gerlach and Lysiak, 2006), los danios cebra son capaces de reconocer a sus hermanos por el olor y poseen un mecanismo de prevención de consanguinidad, por lo que prefieren aparearse con individuos no emparentados con ellos. Esto puede implicar un problema en el laboratorio, donde es habitual la consanguinidad, sobre todo de las estirpes mutantes y transgénicas.

En un experimento realizado por españoles, se observó que los peces ponían huevos durante las primeras 5 horas tras el encendido de las luces (ciclo de luz-oscuridad: 14-10 horas), pero el mayor pico se producía tres horas tras el encendido de las luces (Blanco Vives and Sánchez Vázquez, 2009). Lo Chai Chen observó personalmente puestas realizadas a medianoche en oscuridad (Chen and Martinich, 1975).

Ya hemos visto que en la naturaleza estos peces se aparean en las orillas, en zonas de muy poca profundidad. Una orilla es una rampa inclinada. En las peceras de reproducción, que tienen fondo plano, nosotros decidimos la profundidad del agua. Pero quizás esta profundidad no sea la favorita de nuestros ejemplares. ¿Por qué no darles un rango de profundidades y dejar que ellos decidan la que prefieran?

---

<sup>5</sup>Es importante entender que los peces no son ratones y no empiezan a aparearse cuando alcanzan cierta edad, sino cierto tamaño. Que un pez tenga 3 meses de vida no es garantía de que ya se pueda aparear.

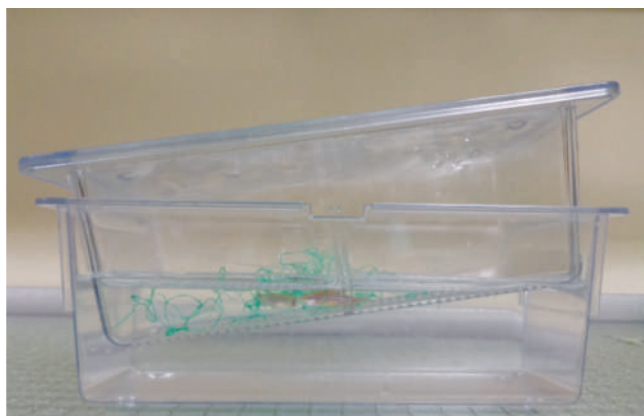


Figura 12.

Esto fue lo que hicieron Anna Sessa y sus colaboradores (Sessa *et al.*, 2008). En las peceras de reproducción *ex situ* con doble fondo es posible colocar inclinada la mitad superior para que forme una rampa (ver Figura 12). Nosotros hemos probado este truco y, aunque no hemos conseguido unos resultados tan espectaculares como los que esta autora muestra en su artículo, sí se nota cierta mejoría en las puestas. Para que dé resultado, es importante que el extremo superior de la rampa quede a la altura del nivel del agua o, incluso, un poco por encima; si queda por debajo del nivel del agua, el resultado es peor (observación personal). A los peces parece gustarles que el fondo esté inclinado y suelen elegir poner en el extremo superior de la rampa, incluso aunque queden momentáneamente emergidos y no puedan respirar. Otra ventaja de este sistema es que los huevos se ven con más facilidad en el fondo inferior. Si no se ha colocado placa separadora, se puede dejar el fondo superior inclinado desde la tarde anterior a la puesta, para que pasen toda la noche así o, en caso de que se haya colocado placa separadora, inclinarlo inmediatamente tras retirarla. Además, si comprobamos que al cabo de 1 o 2 horas no hay huevos en una pecera sin fondo inclinado, podemos inclinarlo y esperar un rato. Hay cierta probabilidad de que ahora se decidan a poner (observación personal).

### ¿Mantener los sexos juntos o separados?

Hay cierta tendencia a mantener en esta especie los sexos por separado, quizás por influencia del ratón. Yo mismo solía hacerlo así, creyendo que si los mantenía juntos se reproducirían sin control en la pecera de estabulación y no pondrían huevos cuando los necesitase.

No obstante, mantener los sexos por separado durante periodos largos de tiempo da problemas. El más importante es que las hembras siguen produciendo óvulos, pero no los ponen. Los óvulos se acumulan dentro del cuerpo de la hembra, lo que puede acarrear dos consecuencias desagradables:

- a) Los óvulos se hacen viejos dentro del cuerpo de la hembra y sufren ataques de hongos (quizás porque el óvulo ha muerto o está moribundo). Cuando, finalmente, esa hembra pone, al principio parece que los huevos están en buen estado. Pero al cabo de una hora, o incluso menos, puede observarse un pequeño micelio en el **interior** de los huevos similar a un puntito blanco (advertimos que dentro del huevo no debe haber **nada** a excepción del embrión y el vitelo). Ese micelio crece rápidamente, cubriéndolo todo. Así pueden perderse puestas enteras. Si esto ocurre, la solución más fácil consiste en reproducir más frecuentemente esos ejemplares (que suelen estar bastante gordos por la acumulación de óvulos), hasta que hayan puesto todos los óvulos viejos y empiecen a generar óvulos jóvenes y libres de hongos (véase más adelante).
- b) Los óvulos mueren dentro del cuerpo de la hembra formando una placa de células muertas que obstruye el tubo ovopositor e impide que ese ejemplar ponga (Spence *et al.*, 2008). La hembra sigue produciendo nuevos óvulos, que se siguen acumulando en el interior de su vientre en un círculo vicioso. El vientre se hincha, deformando la espina dorsal del animal y tensando su piel hasta que acaba sangrando y rasgándose por el más mínimo roce, y el ejemplar termina reventando, literalmente. Estas hembras no podrán poner, incluso aunque se las junte con machos y se les ofrezca el ponedero. Puede probarse a anestesiárlas y darles unos masajes en el vientre en dirección a la cloaca. Pero este método no es seguro y resulta muy delicado. Debido a la tirantez de la piel del vientre y a su fragilidad, es posible romperla y reventar a la hembra. Lo más humano con estos ejemplares es proceder a su eutanasia.

Otro problema de mantener los sexos separados durante periodos prolongados de tiempo estriba en que las hormonas que secretan los peces influyen estimulando el comportamiento reproductor de los individuos del otro sexo<sup>6</sup>. Cuando, finalmente,

<sup>6</sup>Antes del cortejo, los machos secretan feromonas que inducen la ovulación de las hembras; para lograr esto no es ni siquiera necesario juntar machos y hembras, basta con echar las hembras en un recipiente con agua que haya contenido anteriormente

se los vuelve a juntar para que se reproduzcan, les cuesta mucho hacerlo (observación personal).

Gabriele Gerlach (Gerlach, 2006) afirma que las feromonas secretadas por los machos influyen positivamente sobre las hembras no sólo en la puesta, sino también en la viabilidad de los embriones, mientras que las feromonas secretadas por hembras que ella llama «dominantes» (refiriéndose a que forman territorios transitorios en los lugares de puesta), influyen negativamente sobre la aptitud reproductora de otras hembras, a las que llama «subordinadas» (que no forman esos territorios).

En un experimento (Carfagnini *et al.*, 2009) se observó que las hembras mantenidas en acuarios desnudos eran más agresivas que las mantenidas en acuarios con plantas acuáticas artificiales. Hay que tener en cuenta que sólo había 4 hembras en cada acuario. En los acuarios plantados no se observó ninguna relación entre la agresión y la fecundidad, pero en los acuarios desnudos se observó una disminución de la fecundidad por parte de aquellas hembras que sufrían más agresiones.

Las hembras pueden distinguir los sexos de sus vecinos visual u olfatoriamente. Si se las ilumina con luz blanca, pueden distinguir machos de hembras mediante la visión, aunque no puedan olerlos. Si se las ilumina con luz amarilla, necesitan del olfato para distinguirlos (Hutter *et al.*, 2011).

Una tarde me vi forzado a reproducir unos ejemplares que vivían juntos en una pecera con sexos mezclados. No observé ninguna diferencia en la puesta respecto a las realizadas por ejemplares que vivían en peceras con sexos separados. Desde entonces, mantengo los sexos juntos y los problemas que he mencionado anteriormente, prácticamente (salvo casos excepcionales) han desaparecido.

### ¿Se pelean los machos?

Además de reproducirlos por parejas, se pueden reproducir por tríos de un macho y dos hembras o una hembra y dos machos. La reproducción de un macho con dos hembras tiene la ventaja de que poniendo la mitad de cruces, se consiguen el doble de huevos, con lo que se ahorra trabajo y tiempo. Esto se puede hacer si sabemos que esos ejemplares son buenos reproductores. La

---

machos (Whitlock, 2006). Las hembras ovuladas secretan ahora feromonas que estimulan el cortejo de los machos. Éstos cortejan a las hembras y ellas desovan (Harper *et al.*, 2011).

cría de dos machos con una hembra se puede hacer si es muy importante que esa hembra ponga huevos, aunque sean pocos; por ejemplo, porque se pretende fenotiparla observando la expresión de la descendencia. Pero, en este caso, ¿no se pelearán los machos en la pecera de reproducción?

En un artículo anterior (Díaz García, 2006) yo insistía en que estos peces no tienen comportamiento agresivo. Lo cierto es que sí tienen comportamiento agresivo (sobre todo los machos, pero también las hembras), pero mucho más atenuado que en el ratón u otros peces empleados en etología para estudiar la agresividad. Con el danio cebra pasa lo mismo que con otras muchas especies de peces de cardumen (como los belicosos cíclidos centroamericanos o los de los lagos Tanganica y Malawi), cada ejemplar tiene un pequeño territorio individual alrededor de su cuerpo, de aproximadamente 1 o 2 centímetros (observación personal) y no les hace ninguna gracia que los otros individuos lo traspasen. La agresividad, al igual que el resto de comportamientos instintivos, tiene su origen fisiológico en la elaboración de estímulos internos generados por el sistema nervioso central. Estos estímulos internos se acumulan y, cuando sumados a los estímulos externos, sobrepasan cierto valor umbral, el sujeto desencadena la acción instintiva. Esta acción instintiva es más intensa cuanto mayor es la acumulación de estímulos.

En un cardumen, donde cada pez está rodeado por muchos compañeros, se desencadena el comportamiento agresivo muy frecuentemente. Esta conducta agresiva tiene una intensidad muy tenue, porque no da tiempo a que los estímulos internos se acumulen; por eso no se detecta a no ser que se observe muy detenidamente a los animales.

El danio cebra es una especie en la que se detectan diferencias de personalidad entre los distintos individuos. Hay individuos más belicosos y otros que lo son menos. Si ponemos sólo dos individuos en una pecera, el más belicoso se dedicará a perseguir al más apacible por toda la cubeta, hostigándolo sin darle tregua, porque ahora, en vez de repartir su agresividad en dosis pequeñas entre muchos compañeros, la orienta completamente hacia un solo individuo.

No hay que confundir este comportamiento con una jerarquía y decir que el más belicoso es jerárquicamente superior, y el menos belicoso jerárquicamente inferior. Una jerarquía se genera tras un combate, que es típico de especie y ritualizado;

decimos que el ganador es jerárquicamente superior y el perdedor jerárquicamente inferior (Drews, 1993). Esto otro no es ningún combate, el individuo hostigado no se defiende, no se desencadenan todos esos comportamientos de lucha típicos de especie y que tan llamativos nos resultan, sólo huye; se trata de un acoso. Es por ello que resulta muy desaconsejable mantener sólo dos individuos en una pecera de estabulación. No es necesario que sean dos machos. Si no queda más remedio que hacerlo, puede introducirse en la pecera fibra artificial que imite las plantas acuáticas, para que sirva de barrera visual y refugio al pez hostigado.

En la pecera de reproducción en la que hemos colocado un trío de dos machos y una hembra, habitualmente los dos machos se llevan bastante bien. Pero hay algunas ocasiones en las que los dos machos se enzarzan en un auténtico combate. En este caso, no tenemos a un individuo que persigue a otro, sino dos ejemplares que se enfrentan en un combate ritualizado, que sigue pautas de conducta instintivas, y en el que ambos se exhiben ostentosamente (el famoso *display* de los anglosajones) con las aletas desplegadas y mostrando sus colores más intensos. Como estos peces carecen de dientes en la boca, no pueden morderse; el problema es que, al combatir, no se aparean con la hembra, por lo que lo mejor es retirar a uno de ellos (observación personal). Para más información sobre la conducta agresiva de esta especie, puede consultarse a Oliveira *et al.*, 2011).

### La fecundación artificial:

También puede probarse a fecundar artificialmente estos peces. La técnica se ilustra mediante un video en: <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=1396>.

Para extraer semen de los machos, se los anestesia con triclaína de la forma convencional; sobre un soporte hecho con una esponja en la que se ha practicado una hendidura fusiforme (ver Figura 13), se coloca el pez de forma que quede en decúbito supino (ver Figuras 14a y 14b), se pone a una lupa para poder ver la salida del semen, se lo seca con un trozo de papel toallero (porque el agua activa los espermatozoides), se le aprieta suavemente el abdomen con unas pinzas, con los dedos o con los laterales de la propia esponja y, cuando se vea la salida del esperma, se recoge éste con un microcapilar como los que se emplean con ratones. Si no se quiere proceder de inmediato a la fecundación de los óvulos, se echa el semen en un tubo con solución Hanks (Westerfield, 1995) que se pone en hielo. El esperma de pez se puede mantener congelado, como el de ratón, indefinidamente.

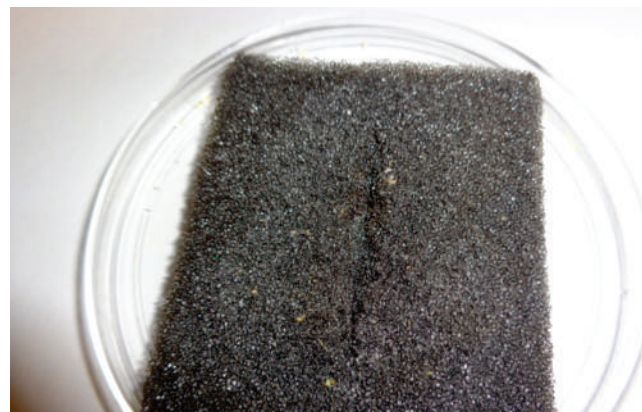


Figura 13.



Figura 14a.

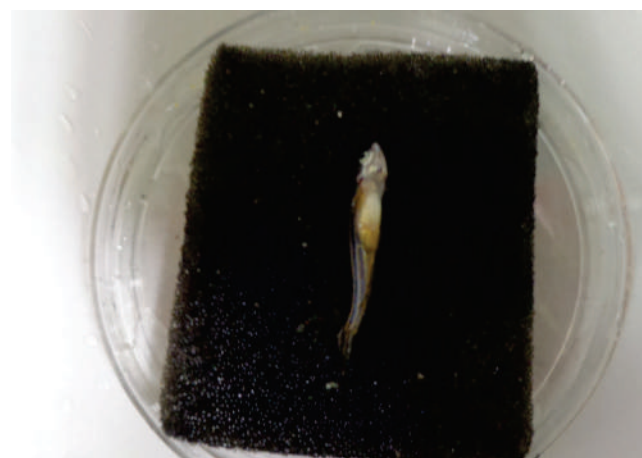


Figura 14b.

Cuando quiera realizarse la reproducción, se anestesian las hembras que se vayan a usar, se saca una del agua, se seca bien, y se coloca sobre una placa de Petri seca. Con los dedos secos, se le presiona *muy suavemente* el extremo anterior del abdomen hasta que salgan los óvulos. Se añaden entre 30 y 50 microlitros de la solución de Hanks con el semen (o éste directamente si se acaba de extraer), se añade 1 ml de agua para activar la fecundación, se revuelve bien y se añade más agua.

Por muy fácil que parezca en el vídeo, este sistema tiene sus trucos. El primero, hay que ser mañoso. Es muy fácil lesionar a los animales o matarlos. Se requiere práctica para extraer correctamente tanto el semen como los óvulos. Éstos deberían salir simplemente presionando con suavidad. El segundo, para extraer óvulos hay que tener en cuenta que las hembras sólo ovulan estimuladas por las feromonas secretadas por los machos. En el PRBB mantienen durante dos días previos machos y hembras en peceras de reproducción, separados mediante la placa divisora, de manera que cada uno pueda estar expuesto a las feromonas del otro, pero sin que puedan aparearse. Durante estos días, alimentan a las hembras con abundantes nauplios de artemia vivos (Juan Ramos, comunicación personal). En el CNIC mantenemos los sexos separados durante dos semanas. A lo largo del día anterior a la fecundación artificial, alimentamos a los reproductores (especialmente a las hembras) con abundantes nauplios de artemia vivos. Por la tarde, colocamos una pareja de peces o un macho y dos hembras en peceras de reproducción, separados por una placa divisora, y los mantenemos así hasta el día siguiente. Como pasan más de 7 horas juntos, es tiempo suficiente para que las hembras ovulen al detectar las feromonas secretadas por el macho (Eaton and Farley, 1974a).

Es más fácil extraer semen de los machos que óvulos de las hembras. En el CNIC, el equipo de transgénesis obtiene sus mejores resultados con machos que han estado más de 2 semanas separados de las hembras (pueden estar separados de las hembras incluso un par de meses sin que la calidad del semen decaiga). Basta entonces una mínima presión para conseguir una eyaculación abundante y con semen de muy buena calidad. Por lo que respecta a las hembras, podemos dividir las en dos grupos: algunas ponen abundantes óvulos en cuanto se aprieta mínimamente su abdomen, y otras no ponen por mucho que se apriete. En lugar de insistir, resulta aconsejable cambiar de hembra si al presionar un poco no pone. De otro modo, además de perder el tiempo se corre el riesgo de matar el pez. Es un error creer que pondrán más huevos o será más fácil la extracción a

partir de hembras con vientres muy abultados (Vanessa Robles, comunicación personal). Resulta más fácil trabajar con hembras que tengan el vientre no demasiado abultado.

Las sesiones de fecundación artificial deben llevarse a cabo por *dos personas al mismo tiempo*, una para extraer semen de los machos y otra para extraer óvulos de las hembras. Una sola persona no puede dar abasto con todo. Además, estas sesiones deben realizarse lo más inmediatamente posible tras el encendido de las luces del acuario, ya que es en ese momento cuando los peces son más propensos a la reproducción.

### EJEMPLOS CONCRETOS

En todos los casos que se describirán a continuación, resulta aconsejable alimentar a los reproductores con abundantes nauplios de artemia viva o comida congelada, además de su comida habitual, a lo largo del día que se los vaya a cruzar.

#### **Tengo unos peces creciendo y quiero saber si ya ponen huevos.**

- Lo más práctico es usar alguno de los sistemas de reproducción *in situ* (Figuras 5-7, 9 y 10). Si los peces están en una pecera de estabulación grande, lo mejor es introducir, al menos, dos peceras de reproducción. Éstas se extraen diariamente al final de la mañana y se observa si hay huevos. Hay que tener en cuenta que como esta especie tiene crecimiento diferencial, el hecho de encontrar huevos no significa que todos los ejemplares de la pecera puedan reproducirse; es probable que los huevos hayan sido puestos por una sola hembra, si son pocos, o por varias hembras, si son muchos.

- También se puede emplear la técnica de reproducción *ex situ* tradicional (Figura 1). No se coloca placa separadora. Es mejor mantener habitualmente los peces de ambos sexos juntos.

#### **Tengo unos peces que ponen huevos, pero crece un micelio en su interior que mata los embriones.**

- La razón es que esas hembras no se reproducen con la suficiente frecuencia y los óvulos pasan demasiado tiempo dentro de su cuerpo, deteriorándose. Hay que conseguir que pongan todos esos óvulos deteriorados y produzcan una nueva generación de óvulos sanos. Lo más práctico es usar alguno de los sistemas de reproducción *in situ* (Figuras 5-7, 9 y 10). Hay que

asegurarse que dentro de la pecera de estabulación hay tanto machos como hembras. Si los peces están en una pecera de estabulación grande, lo mejor es introducir, al menos, dos peceras de reproducción que se extraen al final de la mañana, se recogen los huevos que haya, o se limpian de excrementos y restos de comida, y se vuelven a colocar hasta el día siguiente. Esto se repite diariamente hasta que observemos que ya no crece el micelio dentro de los huevos.

### **¿Por qué al día siguiente de recoger los huevos encuentro algunos muertos?**

- La razón habitual es que no hay desarrollo embrionario (observación personal). Si observamos los embriones unas dos o tres horas tras la puesta, veremos muy fácilmente las distintas células en que se ha dividido el cigoto. Pero es habitual que veamos también algunos huevos que no se están desarrollando: éstos serán los que encontremos muertos al día siguiente. En un experimento realizado fotografiando unas puestas toda la noche empleando la técnica de *time lapse*, comprobamos que esta muerte se produce de forma súbita en un momento concreto (todos los huevos se mueren en un periodo de tiempo inferior a la media hora en puestas logradas mediante separador para que todos los embriones se desarrollen coordinadamente). Ignoramos la razón de esta falta de desarrollo.

### **Necesito que unos peces pongan huevos, pero no lo consigo recurriendo a la técnica de reproducción *ex situ* tradicional a pesar de que lo he repetido varias veces.**

- Para esto es inmejorable la reproducción *in situ* (Figuras 5-7, 9 y 10). Si los peces están en una pecera de estabulación grande, lo mejor es introducir, al menos, dos peceras de reproducción. Éstas se extraen al final de la mañana y se observa si hay huevos. Esto se repite todos los días hasta que pongan suficiente número de huevos.

### **Necesito que unos peces pongan huevos, pero no lo consigo recurriendo a la técnica de reproducción *ex situ* tradicional ni a las técnicas de reproducción *in situ*, como se ha aconsejado antes.**

- En este caso, la única alternativa consiste en intentar la reproducción artificial.

### **He logrado crear un transgénico con una expresión muy buena y ahora quiero generar una estirpe a partir de él.**

- Lo más práctico es usar alguno de los sistemas de reproducción *in situ* (Figuras 5-7). Se ubica ese individuo con uno o dos peces de estirpe salvaje del sexo opuesto en una pecera de estabulación con una pecera de reproducción en su interior. Ésta se extrae al final de la mañana y se observa si hay huevos, que se recogen, y se repite el proceso diariamente hasta conseguir suficiente número de huevos.

- También se puede recurrir al sistema de reproducción *ex situ* tradicional, cruzando semanalmente el pez de interés con uno o dos salvajes del sexo opuesto sin placa separadora (Figura 1).

### **Quiero conseguir una nueva generación y no necesito seleccionar los embriones o sí necesito seleccionarlos, pero no es necesario que todos estén exactamente en el mismo estadio.**

- Lo más práctico es usar alguno de los sistemas de reproducción *in situ* (Figuras 5-7). Si los peces están en una pecera de estabulación grande, lo mejor es introducir, al menos, dos peceras de reproducción. Éstas se extraen al final de la mañana, se recogen los huevos que haya y se vuelven a introducir para volver a recoger huevos al día siguiente hasta que haya suficientes. Hay que tener en cuenta que usando este sistema puede ocurrir que todos los huevos sean del mismo padre.

- Si se desea mayor diversidad genética para evitar un exceso de consanguinidad, debe usarse la técnica de reproducción *ex situ* tradicional (Figura 1). Se cruza el mayor número de parejas posible, no se coloca placa separadora, se recogen todos los huevos y, tras haber retirado los que se hayan muerto al día siguiente, se mezclan todos y se escogen al azar los que queramos conservar. Es mejor mantener habitualmente los peces de ambos sexos juntos.

- Si se dispone de un tanque de puesta masiva (Figuras 4, 9 y 10), se puede usar para este mismo propósito, ubicando en él la mayor cantidad de parejas posible. Se recogen los huevos, que ya estarán mezclados y, tras retirar los que se hayan muerto al día siguiente, se escogen al azar los que queramos conservar.

**Quiero conseguir una nueva generación, pero necesito seleccionar embriones, todos en el mismo estadio.**

- Lo más práctico es recurrir a la técnica de reproducción *ex situ* tradicional. Se debe colocar placa separadora (Figura 2). En cuanto se enciendan las luces del acuario, se retira la placa separadora y se inclina la mitad superior de la pecera de reproducción (Figura 12). Hay más probabilidades de puesta si se usan tríos de dos machos y una hembra. Para evitar un exceso de consanguinidad, una vez retirados los huevos muertos al día siguiente, se mezclan todos los restantes y se escogen al azar los que queremos conservar. Es mejor mantener habitualmente los peces de ambos sexos juntos.

- Una técnica un poco más arriesgada consiste en introducir lo antes posible, por la mañana (aunque también puede dar resultado si se hace a media mañana), una o varias peceras de reproducción dentro de una pecera de estabulación con machos y hembras (Figuras 5-7). Al cabo de un rato, se mira si hay huevos para recoger. Esto se puede repetir diariamente hasta conseguir suficientes huevos.

**Necesito embriones para experimentación, todos en el mismo estadio.**

- Lo más práctico es recurrir a la técnica de reproducción *ex situ* tradicional. Se debe colocar placa separadora (Figura 2). En cuanto se enciendan las luces del acuario, se retira la placa separadora y se inclina la mitad superior de la pecera de reproducción (Figura 12). Hay más probabilidades de puesta si se usan tríos de dos machos y una hembra. En cuanto se vea que hay huevos, se recogen. Es mejor mantener habitualmente los peces de ambos sexos juntos.

- Una técnica un poco más arriesgada consiste en introducir lo antes posible por la mañana (aunque también puede dar resultado si se hace a media mañana), una o varias peceras de reproducción dentro de una pecera de estabulación con machos y hembras (Figuras 5-7). Al cabo de un rato, se mira si hay huevos para recoger.

**Necesito embriones que tengan por progenitor un individuo concreto.**

- Lo más práctico consiste en recurrir al sistema de reproducción *ex situ* tradicional, cruzando semanalmente el pez de interés con uno o dos del sexo opuesto (Figura 1). Si se necesita

que todos los embriones estén en el mismo estadio, debe colocarse placa separadora (Figura 2). Al retirar ésta, inclinar la mitad superior de la pecera de reproducción (Figura 12).

- También puede recurrirse a los sistemas de reproducción *in situ*. Se ubica el individuo de interés con uno o dos peces del sexo opuesto en una pecera de estabulación, con una pecera de reproducción en su interior (Figura 6), que se extrae al final de la mañana y se observa si hay huevos. Éstos se recogen y se repite el proceso diariamente hasta conseguir suficiente número de huevos. Si se necesita que todos los embriones estén en el mismo estadio, debe introducirse la pecera de reproducción dentro de la de estabulación por la mañana y comprobar al cabo de un rato si hay huevos.

**Necesito embriones a los que hay que tratar con feniltiourea (PTU).**

- El PTU no ha de añadirse a los embriones antes de que éstos hayan gastrulado. Esto suele ocurrir de noche, pero no es necesario hacerlo en ese momento, basta con añadir el PTU antes de que empiecen a aparecer manchas en el embrión, y eso no ocurre hasta después de las primeras 24 horas de vida. El PTU se puede añadir, por tanto, a primera hora de la mañana siguiente, tras haber limpiado los huevos. Lo importante es asegurarse que los peces no empiezan a poner la misma tarde en la que se los cruza, sino a la mañana siguiente. Por tanto, lo más práctico consiste en recurrir al sistema de reproducción *ex situ* tradicional, con placa separadora (Figura 2). Tras retirar la placa, se inclina la mitad superior de la pecera de reproducción (Figura 12). Hay más probabilidades de que pongan si se cruzan dos machos con una hembra. Es mejor mantener habitualmente los peces de ambos sexos juntos.

- Aunque es más arriesgado, también puede recurrirse a la reproducción *in situ* ubicando por la mañana una o varias peceras de reproducción dentro de una pecera de estabulación que contenga peces de ambos sexos (Figuras 6 y 7). Al final de la mañana, se retira la pecera de reproducción y se recogen los huevos en caso de que haya.

**Necesito embriones para microinyectar.**

- Lo más importante en este caso es que dé tiempo a microinyectar los embriones cuando aún están en el estadio de una sola célula. Por ello, es imprescindible que los animales pongan los huevos poco a poco y no todos a la vez. La única

alternativa válida es la técnica de reproducción *ex situ* tradicional. Se preparan la tarde anterior a la sesión de microinyección una serie de peceras de reproducción y se les pone placa separadora (Figura 2). Los resultados son **mucho mejores** si se forman tríos de dos machos y una hembra, preferiblemente de peces de menos de año y medio de edad. Cuando, a la mañana siguiente, se quiera que pongan algunos huevos, se retira la placa separadora de 1 o 2 peceras y, preferiblemente, se inclina la mitad superior (Figura 12). Los peces deberían empezar a poner al cabo de escasos minutos, aunque algunos se pueden hacer los remolones y tardar más. Para recoger los huevos, se llena de agua la mitad inferior de otra pecera de reproducción, se traslada la mitad superior junto con los peces a esta nueva mitad inferior, se deja inclinada y se permite que los peces sigan poniendo huevos mientras se recogen los anteriores. Cuando dejen de poner, se retira la placa separadora de 1 o 2 peceras más y se repite todo el proceso. Haciéndolo así, los peces pueden poner a lo largo de toda la mañana, si bien no ponen por la tarde. No deberían usarse los mismos animales más de una vez por semana. Es mejor mantener habitualmente los peces de ambos sexos juntos, pero si se va a microinyectar sistemáticamente varias semanas seguidas, puede que sea más cómodo mantenerlos separados.

### **Necesito fenotipar ejemplares adultos observando la descendencia.**

- Sistema de reproducción *ex situ* tradicional (Figura 1). No se usa placa separadora (excepto que se necesite que estén todos en el mismo estadio, por ejemplo, porque haya que tratarlos con tamoxifeno u otro compuesto). Es mejor mantener habitualmente los peces de ambos sexos juntos, pero si se van a cruzar sistemáticamente los mismos ejemplares varias semanas seguidas, puede que sea más cómodo mantenerlos separados. No es mala idea cruzar, cada pez que se quiera fenotipar, con dos ejemplares del sexo opuesto para aumentar la probabilidad de puesta y el número de huevos.

### **Cuando fenotipo un grupo de ejemplares, al cabo de unas semanas dejan de poner.**

- La técnica más usual para fenotipar una estirpe consiste en cruzar todos los ejemplares posibles la primera semana, fenotipar aquellos que hayan puesto y volver a cruzar los que no hayan puesto la semana siguiente. Esto se repite semana tras semana hasta que hayamos fenotipado todos los ejemplares, o tengamos un número suficiente de positivos.

Pero empleando esta técnica, ocurre un fenómeno que yo denomino «selección de los peores reproductores»; es decir, semana tras semana nos vamos quedando con aquellos ejemplares que no se han reproducido ninguna de las veces anteriores: estamos haciendo una selección inconsciente de los peores reproductores. Por ello, hacia el tercer intento es frecuente que observemos un enorme descenso en el número de puestas o, simplemente, que no haya puestas.

### **Quiero que algunos peces pongan huevos en peceras de reproducción *ex situ*, pero hay machos que no cortejan a sus hembras.**

- Si la pecera no tiene fondo inclinado, puede probarse a inclinarlo.

- Si en otras peceras hay machos que siguen cortejando a sus hembras a pesar de que éstas ya han dejado de poner huevos, pueden trasladarse esos machos a las peceras en las que no se esté produciendo el cortejo. No es necesario retirar al macho que había previamente.

### **Necesito grandes puestas, de varios miles de huevos, todos en el mismo estadio.**

- En caso de que se necesiten sólo esporádicamente, la mejor alternativa sería el iSPAWN (Figura 4).

- Si se necesitan regularmente, las mejores alternativas son el MEPS (Figura 9) o el Aqua Spawner 100 (Figura 10).

- En ambos casos, una alternativa más trabajosa, pero más económica, consiste en emplear el sistema de reproducción *ex situ* tradicional, poniendo placa separadora (Figura 2). Habría que retirar todas las placas separadoras a la vez e inclinar la mitad superior de las peceras. Mejor cruzar dos machos por hembra.

### **Estoy haciendo estudios de comportamiento y debo mantener los peces en condiciones lo más naturales posible, permitiendo que se reproduzcan también de forma natural.**

- Puede probarse con un acuario como el que se describe en la Figura 11. Es más importante la anchura del acuario que su altura. El suelo de la terraza debería estar inclinado, quedando la parte superior de la rampa a ras del agua. Ahí pueden plantarse plantas acuáticas palustres, que mantengan las raíces sumergidas, pero

tallos aéreos (*Ludwigia*, *Limnophila*, *Eleocharis*, *Hygrophila*, *Scirpus*, musgos acuáticos, etc.). La densidad de peces debería ser baja. Un sistema así sirve sólo para que los peces vayan poniendo huevos, pero éstos se perderán.

- Otra posibilidad consiste en tenerlos en un acuario sin terrazas, con una densidad baja de peces, en el que se coloquen varios recipientes de reproducción *in situ* (Figuras 5-7) pegados a distintas paredes, a ras del agua, con distintas orientaciones por si los peces tuvieran alguna preferencia.

### ¿Puede adiestrarse a los peces para que pongan huevos?

Parcialmente, sí. Si se cruzan periódicamente los mismos ejemplares (por ejemplo, todos los martes durante varias semanas seguidas), esos ejemplares se acostumbrarán a ese ritmo de reproducción y al cabo de algunas semanas, observaremos que las puestas son mejores que al principio.

### Agradecimientos

El autor desea agradecer a Vanesa Robles y Juan Ramos que hayan compartido con él sus experiencias y consejos relativos a la inseminación artificial de danios cebra. También desea agradecer a Juan de Dios Hourcade su implicación en la edición de este artículo.

### BIBLIOGRAFÍA

- Adatto I., Lawrence C., Thompson M., and Zon L.I. *A New System for the Rapid Collection of Large Numbers of Developmentally Staged Zebrafish Embryos*. Plos One 2011, 2906.6(6).
- Blanco Vives B. and Sánchez Vázquez F.J. *Synchronisation to light and feeding time of circadian rhythms of spawning and locomotor activity in zebrafish*. Physiology and Behavior 2009, 98:268-75.
- Carfagnini A.G., Rodd F.H., Jeffers K.B., and Bruce A.E.E. *The effects of habitat complexity on aggression and fecundity in zebrafish (Danio rerio)*. Environ Biol Fish 2009, 86:403-9.
- Castranova D. et al. *The Effect of Stocking Densities on Reproductive Performance in Laboratory Zebrafish (Danio rerio)*. Zebrafish 2011, 8(3): 141-6. doi:10.1089/zeb.2011.0688.
- Chen L.C. and Martinich R.L. *Pheromonal stimulation and metabolite inhibition of ovulation in the zebrafish, brachydanio rerio*. Fishery Bulletin 1975, 73(4):889-94.
- Darrow K.O. and Harris W.A. *Characterization and Development of Courtship in Zebrafish*. Danio rerio 2014, 1(1): 40-5. doi:10.1089/154585404774101662.
- Delaney M. et al. *Social interaction and distribution of female zebrafish (Danio rerio) in a large aquarium*. Biological Bulletin 2002, 203: 240-1.
- Díaz García E. *El Danio Cebrá (Danio rerio) (Hamilton, 1822) como animal de laboratorio*. Animales de Laboratorio 2006, 34:4-39.
- Drews C. *The Concept and Definition of Dominance in Animal Behaviour*. Behaviour 1993, 125(3):283-313.
- Eaton R.C. and Farley R.D. *Spawning Cycle and Egg Production of Zebrafish, Brachydanio rerio, in the Laboratory*. Copeia 1974a, 1: 195-204.
- Eaton R.C. and Farley R.D. *Growth and the Reduction of Dependence of Zebrafish, Brachydanio rerio, Reared in the Laboratory*. Copeia 1974b, 1: 204-9.
- Engeszer R.E., Patterson L.B., Rao A.A., and Parichy D.M. *Zebrafish in the Wild: A Review of Natural History and New Notes from the Field*. Zebrafish 2007, 4(1):21-40.
- Gerlach G. *Pheromonal regulation of reproductive success in female zebrafish: female suppression and male enhancement*. Animal Behaviour 2006, 72:1119-24.
- Gerlach G. and Lysiak N. *Kin recognition in zebrafish based on phenotype matching*. Animal Behaviour 2006, 71:1371-7.
- Gonsar N., Schumann A.C., Buchard J.N., and Liang J.O. *An Inexpensive, Efficient Method for Regular Egg Collection from Zebrafish in a Recirculating System*. Zebrafish 2012, 9(1): 50-5. doi:10.1089/zeb.2011.0727.
- Goolish E.M. and Okutake K. *Lack of gas bladder inflation by the larvae of zebrafish in the absence of an air-water interface*. Journal of Fish Biology 1999, 55: 1054-63.
- Harper C. and Lawrence C. *The Laboratory Zebrafish*. CRC Press Taylor and Francis Group 2011.
- Hutter S., Penn D.J., Magee S., and Zala S.M. *Reproductive behaviour of wild zebrafish (Danio rerio) in large tanks*. Behaviour 2010, 147(5-6): 641-60. doi:10.1163/000579510X12632972473944.
- Hutter S., Zala S.M., and Penn D.J. *Sex recognition in zebrafish (Danio rerio)*. J Ethol 2011, 29:55-61.
- Kang J., Nachtrab G., and Poss K.D. *Local Dkk1 Crosstalk from Breeding Ornaments Impedes Regeneration of Injured Male Zebrafish Fins*. Developmental Cell 2013, 27:19-31.
- Larson E.T., O'Malley D.M., and Melloni Jr. R.H. *Aggression and vasotocin are associated with dominant-subordinate relationships in zebrafish*. Behavioural Brain Research 2006, 167:94-102.
- Lawrence C. *The husbandry of zebrafish (Danio rerio): A review*. Aquaculture 2007, 269:1-20.
- Legault R. *A technique for controlling the time of daily spawning and collecting of eggs of the zebrafish, Brachydanio rerio*. Copeia 1958, 4: 328-30.

## Artículos

- McClure M.M., McIntyre P.B., and McCune A.R. *Notes on the natural diet and habitat of eight danionin fishes, including the zebrafish Danio rerio*. Journal of Fish Biology 2006, 69: 553-70.
- Oliveira R.F., Silva J.F., and Simões, J.M. *Fighting Zebrafish: Characterization of Aggressive Behavior and Winner-Loser Effects*. Zebrafish 2011, 8(2): 73-81.
- Paull G.C. et al. *Dominance Hierarchies in Zebrafish (Danio rerio) and Their Relationship with Reproductive Success*. Zebrafish 2010, 7(1): 109-17.
- Pyron M. *Female preferents and male-male interactions in zebrafish (Danio rerio)*. Can. J. Zool. 2003, 81: 122-5.
- Sessa A.K. et al. *The Effect of a Depth Gradient on the Mating Behavior, Oviposition Site Preference, and Embryo Production in the Zebrafish, Danio rerio*. Zebrafish 2008, 5(4): 335-9.
- Spence R. et al. *The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh*. Journal of Fish Biology 2006, 69: 1435-48.
- Spence R., Gerlach G., Lawrence C., and Smith C. *The behaviour and ecology of the zebrafish, Danio rerio*. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 2008, 83(1): 13-34.
- Spence R., Jordan W.C., and Smith C. *Genetic analysis of male reproductive success in relation to density in the zebrafish, Danio rerio*. Frontiers in Zoology 2006, 3: 5. doi:10.1186/1742-9994-3-5.
- Spence R. and Smith C. *Male territoriality mediates density and sex ratio effects in the zebrafish (Danio rerio)*. Animal Behaviour 2005, 69: 1317-23.
- Spence R. and Smith C. *Mating preference of female zebrafish, Danio rerio, in relation to male dominance*. Behavioral Ecology 2006, 17: 779-83.
- Uusi-Heikkilä S., Wolter C., Meinelt T., and Arlinghaus R. *Size-dependent reproductive success of wild zebrafish Danio rerio in the laboratory*. Journal of Fish Biology 2010, 77: 552-69.
- Walker C., Walsh G.S., and Moens C. *Making Gynogenetic Diploid Zebrafish by Early Pressure*. J Vis Exp. 2009, (28). pii: 1396. doi:10.3791/1396.
- Watt P.J. et al. *Small Subordinate Male Advantage in the Zebrafish*. Ethology 2011, 117: 1003-8.
- Westerfield M. *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*. 3<sup>o</sup> Ed. Eugene (Oregón): University of Oregon Press 1995.
- Whitlock K.E. *The Sense of Scents: Olfactory Behaviors in the Zebrafish*. Zebrafish 2006, 3(2): 203-13.
- Wickler W. *La cría de los peces de acuario*. 1<sup>o</sup> Ed. Barcelona (Cataluña): Vida Acuática 1968.



Foto: shutterstock



## ELECCIÓN DE LA SEDE PARA EL CONGRESO SECAL 2017

Para la elección de la sede cualquier socio de la SECAL con un mínimo de dos años de antigüedad puede presentar una candidatura.

Las bases están explicadas en el libro blanco de congresos y jornadas que tenéis disponible en nuestra página web.

### La información mínima que se debe enviar es:

- 1 Ubicación y conexiones: infraestructura aeroportuaria, ferroviaria y por carretera.
- 2 Infraestructura general de la sede: situación, descripción general, servicios generales.
- 3 Número y características de las salas y aulas.
- 4 Descripción del área de exposición científica y técnica.
- 5 Infraestructura hotelera de la ciudad, en especial la situada próxima a la sede, con presentación de diferentes categorías de hoteles incluyendo precios estimados de habitaciones standard.
- 6 Propuesta de Programa Social: excursiones, actividades culturales...
- 7 Propuesta de secretaría técnica.
- 8 Estimación presupuestaria: Capítulo de Ingresos y gastos.
- 9 Cartas relevantes de apoyo a la candidatura.

Esta información debe ser enviada a  
[secretaria@secal.es](mailto:secretaria@secal.es)  
antes del 18 de agosto de 2015.

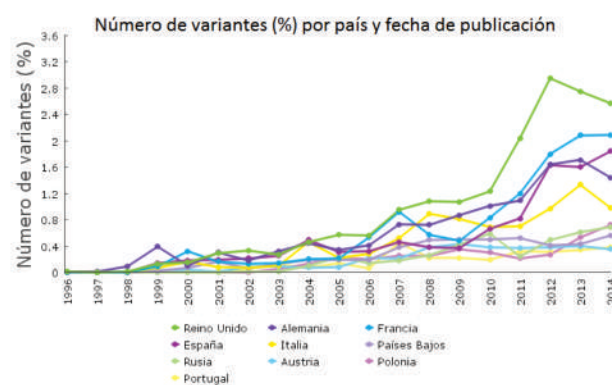
# El pez cebra: ¿El nuevo aliado de la Industria Alimentaria?

**Virginia Navarro, Sandra Rainieri y Miguel Angel Pardo**  
 Azti-Tecnalia, Investigación Alimentaria Parque Tecnológico de Bizkaia

En las últimas décadas, el modo de vida de nuestra sociedad ha variado notablemente, provocando cambios, a su vez, en nuestros hábitos alimentarios. La incorporación de la mujer a la vida laboral, las largas jornadas fuera del hogar, los comedores escolares, etc. hacen del acto de cocinar algo casi anecdótico o lúdico para muchas personas. Al mismo tiempo, el poder de convicción de los medios de comunicación y una mayor cultura de la salud en general, han influido enormemente en nuestra forma de alimentarnos. En este panorama, la industria alimentaria se ha ido transformando con el fin de cubrir las demandas de la población. Uno de los grupos de productos más innovadores que han surgido en los últimos tiempos ha sido el grupo de los alimentos funcionales.

Los **alimentos funcionales** se definen como aquellos alimentos que además de presentar unas características nutricionales determinadas como parte de una dieta equilibrada, presentan componentes biológicos que pueden mejorar la salud y/o reducir el riesgo de contraer enfermedades. Hasta hace unos años no existía una legislación que regulara explícitamente las alegaciones que pueden hacerse en el etiquetado de los alimentos. Sin embargo, en los últimos años se está desarrollando en Europa una legislación que pretende proteger a los consumidores de los mensajes engañosos o inciertos. Así, para que las empresas puedan realizar alegaciones de salud en sus productos, deben suministrar evidencias científicas de la actividad biológica beneficiosa de los alimentos funcionales, así como de las moléculas bioactivas que presentan en su composición.

Si bien muchos alimentos contienen una cantidad suficiente de compuestos activos (minerales, vitaminas, ácidos grasos, fibra alimenticia, antioxidantes, etc.) como para realizar alegaciones, una de las estrategias para desarrollar estos productos es agregarles estos componentes. El desarrollo de este tipo de alimentos se ha convertido en una fuente muy importante de nuevos productos para la industria, creciendo también el interés de ésta por compuestos bioactivos de origen alimentario que puedan ejercer un efecto beneficioso sobre la salud (ver Figura 1).



**Figura 1.-** Porcentaje de alimentos funcionales lanzados respecto del total de lanzamientos en Europa. Fuente: Mintel.

Los estudios necesarios para la evaluación de la efectividad de moléculas bioactivas destinadas a la alimentación humana se realizan mayoritariamente en experimentos con animales, principalmente roedores. Sin embargo, este tipo de ensayos son muy laboriosos y costosos, e implican sacrificar un gran número de animales de experimentación. Por este motivo se está haciendo un gran esfuerzo en desarrollar métodos alternativos a la experimentación animal y más acordes con el principio de las tres Rs; Reemplazar, Reducir y Refinar. Esto no implica que se pueda prescindir completamente de la experimentación animal, ya que antes de comercializar una nueva molécula bioactiva en el sector alimentario siempre es necesaria la fase de experimentación en roedores, pero sí es posible reducir considerablemente el número de dichos experimentos. Este objetivo se puede conseguir poniendo a punto estrategias alternativas, que permitan realizar de forma rápida un *screening* preliminar de varias moléculas, para seleccionar aquellas que sean más efectivas. Estas estrategias alternativas incluyen los ensayos *in vitro* que no implican el uso de animales de laboratorio y que consisten en estudiar la efectividad en líneas celulares determinadas, o en microorganismos unicelulares (bacteria y levadura). Otra alternativa es el empleo de modelos multicelulares como por ejemplo los nematodos (*Caenorhabditis elegans*) o los embriones de peces, y especialmente, del modelo

animal pez cebra (*Danio rerio*). La principal ventaja de la utilización de estos sistemas alternativos frente a los ensayos celulares *in vitro*, es que nos permiten analizar la respuesta general de un organismo entero, lo que representa una respuesta más cercana a la que se obtiene en las pruebas *in vivo* con animales de experimentación.

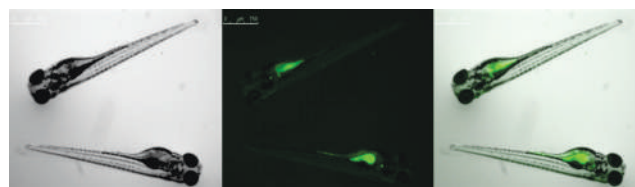
El pez cebra es un modelo vertebrado que está siendo extensamente utilizado para estudiar diferentes procesos biológicos compartidos con los humanos. En particular, en medicina se ha empleado como modelo para el estudio del cáncer, de disfunciones cardiovasculares, diabetes, y disfunciones del sistema nervioso. Además, este modelo se ha revelado como un valioso sistema de *screening* en la validación de la funcionalidad de todo tipo de fármacos. Esta aplicación nos permite plantearnos realizar estudios de efectividad de moléculas bioactivas en el modelo animal pez cebra, principalmente en embriones. Los embriones de pez cebra presentan una serie de características que los hacen muy interesantes para poder llevar a cabo estos ensayos de efectividad. A continuación detallamos las más relevantes:

- La fertilización y desarrollo externo permiten que la observación del huevo fecundado sea mucho más fácil que con otros modelos animales.
- Los embriones son transparentes y los órganos internos se pueden ver fácilmente. Además se puede visualizar la incorporación de compuestos marcados, así como monitorizar la expresión de proteínas marcadas fluorescentemente (transgénicos).
- Su pequeño tamaño, tanto de embriones como de larvas, permite minimizar los volúmenes, y por tanto los costes de los compuestos y extractos necesarios (que pueden llevarse a cabo en placas de pocillos que facilitan un examen rápido y por lo tanto, facilita la realización de experimentos a gran escala).
- Los costes son menores que la experimentación basada en mamíferos.
- Es preferido desde un punto de vista ético, en relación con otros vertebrados, como animal de experimentación.
- Se conoce muy bien su genoma, por lo que se pueden realizar ensayos de genómica funcional.

Por estos motivos, en AZTI-Tecnalia hemos incorporado hace varios años este modelo como sistema para evaluar la efectividad de moléculas bioactivas que puedan ser añadidas a alimentos

funcionales. De hecho, somos pioneros en la aplicación de este modelo alternativo en investigación alimentaria. En la actualidad, en las instalaciones de Derio (Bizkaia) disponemos de un centro de experimentación de pez cebra que consta de una zona de mantenimiento que puede llegar a almacenar entre 1500 y 1600 peces adultos, y permite obtener cientos de embriones al día.

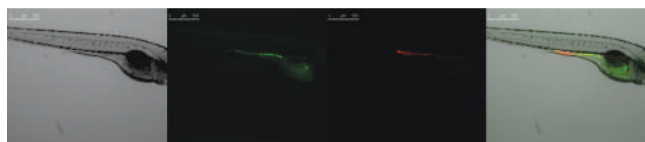
En este momento, estamos desarrollando varias pruebas para detectar la posible efectividad de moléculas a nivel de sistema inmune, capacidad antiinflamatoria, metabolismo lipídico, tejido óseo y capacidad antioxidante. Además, se ha desarrollado un modelo gnotobiótico que permite evaluar las propiedades probióticas de microorganismos mediante ensayos de colonización y adhesión, así como los anteriormente mencionados de capacidad antiinflamatoria e inmunomoduladora. Estas propiedades beneficiosas se evalúan, principalmente, a nivel del sistema digestivo que presenta muchas similitudes con el de humanos. Entre las similitudes más importantes se encuentran aquellas relacionadas con la respuesta inmune innata, que es de gran importancia en peces, como la cascada pro-inflamatoria, el reclutamiento de macrófagos y la secreción de mucus. De hecho, durante los últimos años el pez cebra se ha postulado como un importante modelo para elucidar las bases moleculares de la respuesta inmune, como modelo de infección de un considerable número de patógenos y finalmente para estudiar las interacciones entre la microbiota y el huésped. De forma análoga, en AZTI se ha establecido un modelo que permite evaluar la capacidad inmunomoduladora de polisacáridos, como por ejemplo extractos de microalgas (ver Figura 2), mediante ensayos de expresión génica de una batería de marcadores y/o su capacidad protectora frente a una infección bacteriana.



**Figura 2.-** Larvas de pez cebra expuestas a un polisacárido marcado fluorescentemente.

También se ha puesto a punto un modelo de enterocolitis química que permite evaluar la capacidad antiinflamatoria de biomoléculas y microorganismos potencialmente probióticos. Este modelo se complementa con un pez transgénico que permite monitorizar el reclutamiento de macrófagos, marcados

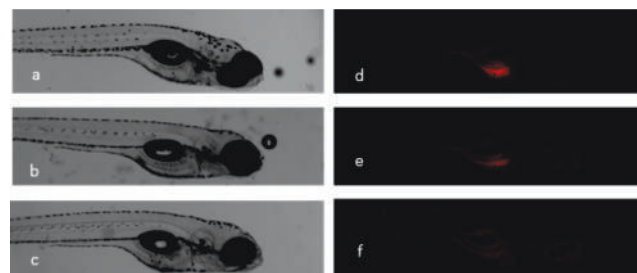
fluorescentemente, a tiempo real. Finalmente, y gracias al desarrollo de un modelo gnotobiótico (del griego *bios* “microbiota” y *gnotos* “conocido”), también podemos realizar ensayos de competición de probióticos por los sitios de adhesión en presencia de patógenos (ver Figura 3).



**Figura 3.-** Larva de pez cebra expuesta a un probiótico (en rojo) y un patógeno (en verde) marcados fluorescentemente.

El modelo pez cebra es también una herramienta muy útil para el estudio de la efectividad de los compuestos bioactivos sobre el metabolismo lipídico. El metabolismo lipídico está altamente conservado entre vertebrados a muchos niveles: anatómico, celular, metabólico, señalización... Los órganos del sistema digestivo son los mismos (hígado, intestino, páncreas) y su formación está controlada por programas de desarrollo similares a los presentes en mamíferos. Las células que forman estos órganos son similares (enterocitos, hepatocitos...), e incluso cuando la estructura del órgano parece diferente, los tipos celulares y la organización celular son los mismos. Además, consumen los mismos lípidos y comparten el transporte y las rutas lipolíticas de la mayoría de los mamíferos. Es más, producen bilis en el hígado, transportan grasa y colesterol en lipoproteínas, realizan beta-oxidación y almacenan triglicéridos en depósitos visceral, subcutáneo e intramuscular, tal y como ocurre en los mamíferos. Es por estas similitudes que el pez cebra se utiliza en investigación sobre enfermedades relacionadas con los lípidos, incluyendo la aterosclerosis inducida por dietas ricas en colesterol, en obesidad inducida por la dieta, o en pruebas sobre la efectividad de productos naturales a este nivel. En AZTI también se trabaja en la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico, y en valorar la mayor oxidación de la reserva grasa de la larva como método de *screening* de efectividad de compuestos bioactivos (ver Figura 4).

Todos estos sistemas de evaluación de la efectividad a nivel de metabolismo lipídico pueden emplearse igualmente en el modelo gnotobiótico, ya que se ha demostrado una fuerte relación entre la microbiota intestinal y el metabolismo lipídico. Es más, se ha identificado una flora intestinal diferente en población obesa respecto de la población normopeso saludable. La diferente utilización de los nutrientes por las bacterias presentes



**Figura 4.-** Aumento del consumo del depósito de grasa del embrión del pez cebra expuesto a dosis concretas de dos compuestos de origen vegetal (e) y (f) frente al control (d). (a), (b) y (c) son imágenes en campo claro del mismo embrión.

en el tracto gastrointestinal provoca la liberación de moléculas que afectan al funcionamiento de diversos procesos, siendo capaces de modular la homeostasis de lípidos y de la glucosa, así como la inflamación sistémica del hospedador.

Además, este modelo resulta vital para poder acercarse a la efectividad de algunas moléculas al verdadero proceso metabólico que sufrirán cuando sean ingeridas por un individuo obeso. De hecho, obviando la digestión, la metabolización por parte de la flora intestinal es el primer paso en la transformación de las biomoléculas y, en algunos casos, es un paso necesario para generar moléculas activas. Es decir, moléculas que no tienen ningún efecto *per se* pueden transformarse en moléculas efectivas tras ser utilizadas por algún organismo concreto que se encuentre colonizando el intestino.

Otro método que se ha puesto a punto en AZTI es la determinación del efecto antioxidante de moléculas bioactivas. En este caso, el proceso consiste en causar un estrés oxidativo mediante exposición de embriones de pez cebra a pro-oxidantes conocidos y averiguar si la administración de la molécula bioactiva reduce dicho efecto. Existen numerosos ensayos que permiten identificar la formación de estrés oxidativo, tanto a nivel cualitativo como cuantitativo. Sin embargo, la mayoría de ellos están pensados para procedimientos *in vitro*, que en algunos casos utilizan líneas celulares, y en otros, simplemente, combinaciones de reactivos. La información proporcionada por dichos ensayos no toma en consideración que los organismos tienen la capacidad de responder naturalmente a condiciones de estrés oxidativo, y que es importante tener en cuenta esa información para definir si una molécula puede o no reducir el nivel de estrés oxidativo. De aquí la importancia de desarrollar métodos *in vivo*, en organismos enteros, que permitan una evaluación completa del sistema de óxido-reducción de los

vertebrados. Los embriones de pez cebra se han revelado como un modelo excelente para este fin. De hecho, la comparación de resultados obtenidos con ensayos *in vitro* y con el pez cebra ha evidenciado cómo a veces se evalúan erróneamente algunas sustancias hasta llegar a producir un efecto opuesto al esperado, dependiendo de las condiciones generales del organismo que se usa como modelo biológico en un determinado ensayo.

A modo de conclusión, el uso alternativo del modelo animal pez cebra para realizar el *screening* de compuestos bioactivos, con efectos potencialmente beneficiosos para la salud humana, es una prometedora línea de investigación que estamos potenciando desde la Unidad de Investigación Alimentaria de AZTI-Tecnalia, con el objetivo de reducir el uso de animales en experimentación, lo que permite reducir coste y tiempo a las empresas del sector interesadas en descubrir nuevas sustancias bioactivas que puedan ser incluidas en alimentos funcionales.



Foto: shutterstock



PRINCIPIOS ÉTICOS EN INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA CON MODELOS ANIMALES

4

LAS PERSONAS QUE TOMEN PARTE EN LOS PROCEDIMIENTOS CON ANIMALES DEBEN TENER FORMACIÓN ESPECÍFICA EN CIENCIAS DEL ANIMAL DE LABORATORIO, ADECUADA AL TIPO DE INTERVENCIÓN QUE REALICEN. LA SALUD Y BIENESTAR DE LOS ANIMALES DEBE SER PERMANENTEMENTE CONTROLADA POR PERSONAL LEGALMENTE CAPACITADO.



# SECAL SPCAL

XIII CONGRESO SECAL – III CONGRESSO SPCAL

I CONGRESO IBÉRICO DE CIENCIAS DEL ANIMAL DE LABORATORIO – I CONGRESSO IBÉRICO DE CIÊNCIAS DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO

*New partnerships for better science*



Cáceres, 18,19 y 20 de noviembre de 2015  
Centro de Cirugía de Mínima Invasión "Jesús Usón"



[www.secal-spcal2015.com](http://www.secal-spcal2015.com)

# El pez cebra como modelo experimental en Nanotoxicología

**Amaia Orbea, Unai Vicario-Parés, José M. Lacave y Miren P. Cajaraville**

*Grupo de Investigación "Biología Celular en Toxicología Ambiental",*

*Dpto. Zoología y Biología Celular Animal, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)*

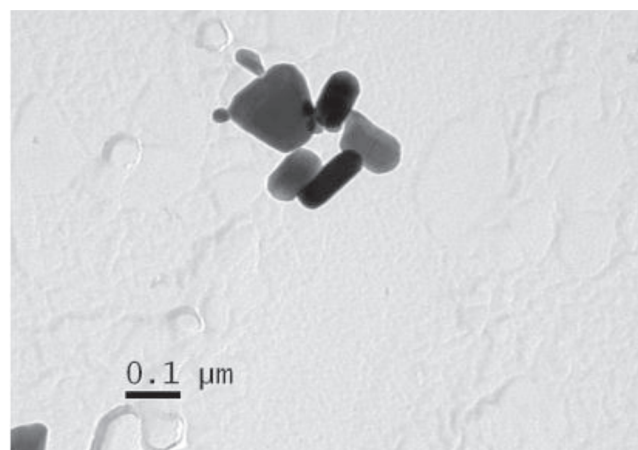
## Resumen

Debido al enorme avance que la Nanotecnología está experimentando en los últimos años, el número de aplicaciones que incluyen nanomateriales o que los utilizan en sus procesos de producción está aumentando de forma exponencial. Este hecho está asociado a una mayor exposición a estos materiales, bien sea de forma directa o indirecta, como consecuencia del aumento de su concentración en el medio ambiente. Sin embargo, nuestro conocimiento de los posibles efectos tóxicos de estos materiales para la salud humana y del medio ambiente es aún limitado. El pez cebra ofrece numerosas ventajas como modelo animal para avanzar en el conocimiento sobre la toxicidad de los nanomateriales, así como para proporcionar la base científica necesaria para la evaluación del riesgo asociado a la utilización de nanomateriales, contribuyendo de esta forma a la regulación de su uso.

## Introducción: nanotecnología y nanotoxicología

La Nanotecnología es la capacidad de manipular la materia a escala atómica, molecular y supramolecular. Es decir, la capacidad de fabricar materiales –nanomateriales– con propiedades controladas en la escala de los nanómetros (1 nanómetro = 1 nm =  $10^{-9}$  m = 1 milmillonésima parte de un metro). La cantidad de aplicaciones, algunas existentes hoy en día y otras potenciales, de los nanomateriales en campos tan variados como la ingeniería, la electrónica, la biotecnología, la cosmética y la medicina, entre otros, parece ilimitada. De hecho, en la actualidad hay cientos de productos de consumo que contienen nanomateriales. Algunos de estos productos son de uso personal y diario como, por ejemplo, las cremas con filtros solares a base de nanopartículas de dióxido de titanio o de óxido de zinc (ver Figura 1) y las lavadoras de uso doméstico a base de nanopartículas de plata. La acción bactericida de la plata soluble se intensifica en el caso de la nanoplatina, convirtiéndola en un material de gran interés para la industria textil y para el diseño de superficies con todo tipo de aplicaciones "libres de microorganismos". Estos dos ejemplos son

también muy ilustrativos del escenario de exposición diaria a nanomateriales al que podemos tener que enfrentarnos, siendo previsible que esta exposición aumente en los próximos años. Además, la creciente utilización de estos productos está inexorablemente ligada a una mayor entrada de los mismos en el medio ambiente y, por tanto, a la exposición de los organismos que habitan los distintos ecosistemas. En este contexto, el medio acuático es especialmente susceptible, al ser los cauces fluviales y las aguas costeras los principales receptores de los residuos generados.



**Figura 1.-** Micrografía obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión de nanopartículas comerciales (Sigma-Aldrich Co.) de óxido de zinc. Cortesía de Eugenia Valsami-Jones y Laura-Jayne Ellis de la Universidad de Birmingham (Reino Unido).

La Toxicología abarca el estudio de los efectos nocivos de las sustancias químicas para los sistemas biológicos. Los nanomateriales no presentan las mismas propiedades físico-químicas que los materiales en forma masiva o "convencionales", a pesar de estar compuestos de las mismas moléculas. La reducción en tamaño hasta la escala nanométrica les confiere propiedades impredecibles a partir de su estructura molecular, como el caso de la plata anteriormente mencionado. La relación entre el área superficial y la masa aumenta de forma exponencial según se

reduce el tamaño de las partículas. El aumento en el número de átomos en superficie provoca un aumento en su reactividad química. Además, la escala nanométrica es la escala de las biomoléculas: la doble hélice de ADN tiene un diámetro de 2 nm, las membranas biológicas tienen un grosor de 6-10 nm. Por lo tanto, el hecho de que la interacción entre las biomoléculas y los nanomateriales se dé en la misma escala espacial facilita la translocación de los nanomateriales en el interior de los organismos a través de barreras, como la barrera hematoencefálica, lo que no es posible para materiales de mayor tamaño. Estas diferencias entre los materiales convencionales y sus formas nano llevó a Donaldson y colaboradores a proponer en 2004 una nueva categoría dentro de la Toxicología, denominada Nanotoxicología, que se dedica al estudio de los potenciales efectos deletéreos específicos de los nanomateriales (Donaldson *et al.*, 2004).

### El modelo animal del pez cebra en toxicología y nanotoxicología

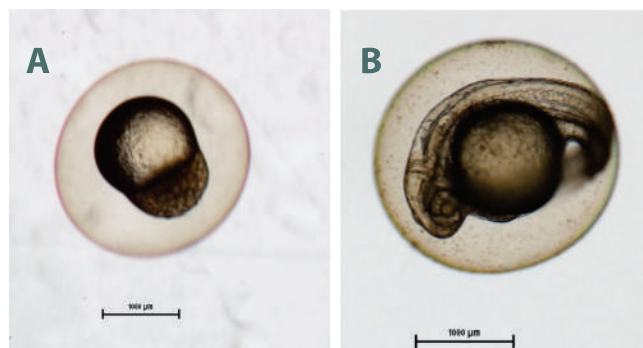
El pez cebra es un modelo animal muy apreciado en diferentes ámbitos de la Biomedicina, siendo la Biología del Desarrollo un área en la que ha sido utilizado de forma especialmente exitosa a partir de los estudios realizados en el laboratorio de George Streisinger, Charles Kimmel y colaboradores de la Universidad de Oregon (EE.UU.), a partir de finales de los años 70. Posteriormente, la validez del pez cebra como modelo en Toxicología ha sido ampliamente reconocida (Spitsbergen and Kent, 2003). Las ventajas que ofrece el pez cebra como modelo animal en diversas áreas de la Biomedicina, lo hacen también especialmente interesante para su utilización en el campo de la Toxicología y la Nanotoxicología (Fako and Furgeson, 2009).

Las propiedades físico-químicas y, por tanto, la biodisponibilidad y toxicidad de los nanomateriales, dependen de multitud de factores, algunos intrínsecos a los propios materiales y otros relacionados con el medio en el que se encuentran. Entre los factores intrínsecos más relevantes están la composición química del material, el tamaño y la forma de la partícula, las modificaciones superficiales a las que ha podido ser sometido (funcionalización) y los agentes estabilizantes utilizados en su formulación, entre otros. La composición química del medio en el que se encuentra el material es un factor crucial para su comportamiento y, por tanto, para su toxicidad. El medio interno de los organismos, así como los medios de cultivo celular,

son ricos en proteínas, que inmediatamente forman una "corona" proteica alrededor de las nanopartículas que gobierna su interacción con el resto de biomoléculas. En el medio natural y específicamente en los ecosistemas acuáticos, la hidrodinámica y la composición iónica del medio, así como la cantidad de materia orgánica presente determinarán la solubilidad de los materiales y su tendencia a agregarse/aglomerarse y precipitar. Por tanto, en la práctica, la combinación de todos estos factores resulta en una cantidad ilimitada de posibilidades a analizar cuando se pretende estudiar la toxicidad de los nanomateriales.

Esta gran cantidad de variables requiere de modelos animales que permitan un estudio sistemático a gran escala, fiable y reproducible. El ensayo de toxicidad aguda con embriones de pez cebra, según el protocolo estandarizado OECD TG 236 (OECD, 2013), representa una herramienta muy útil para analizar de forma rápida y relativamente barata una gran cantidad de compuestos o variantes de los mismos compuestos. Los resultados de este ensayo permiten calcular parámetros toxicológicos altamente relevantes, como son los  $EC_x$  o concentraciones a las que se observa un determinado efecto en un porcentaje X de la población, siendo la  $LC_{50}$ , o concentración letal para el 50% de la población, uno de los más utilizados. La comparación de los valores  $LC_{50}$  para diferentes nanomateriales permite establecer un rango de toxicidad y determinar qué parámetros contribuyen de forma más relevante a la toxicidad aguda encontrada (Vicario-Parés *et al.*, 2014). Por tanto, este sistema permite generar gran cantidad de datos (*High Throughput Screening*) que contribuyen a la evaluación del riesgo asociado a la exposición a estas sustancias. Además, este procedimiento es un método alternativo a la utilización de animales juveniles y adultos en la evaluación de la toxicidad aguda, postulándose como una clara alternativa al ensayo OECD TG 203 (OECD, 1992). Los ensayos de validación llevados a cabo por la OECD demuestran que la prueba con embriones es transferible y reproducible entre laboratorios y los resultados obtenidos no son mejores ni peores que los obtenidos en juveniles o adultos (Lammer *et al.*, 2009).

La evaluación de la mortalidad en los embriones de pez cebra es un procedimiento muy sencillo en comparación con los embriones de otros modelos animales de vertebrados. En condiciones óptimas de laboratorio, una hembra adulta de pez cebra (a partir de los 4 meses de edad) puede producir más de 200 huevos viables semanalmente. El desarrollo embrionario en el pez cebra es externo y el embrión es totalmente transparente (ver Figura 2), lo que permite la observación directa al microscopio de



**Figura 2.-** Embrión de pez cebra de 3 (A) y 24 (B) horas post-fertilización desarrollándose normalmente.

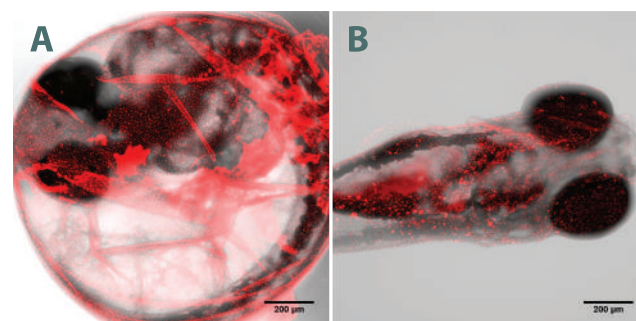
cualquier alteración de dicho proceso sin interferir de ningún modo en el mismo. Además de la mortalidad, el ensayo de toxicidad aguda con embriones de pez cebra permite estudiar multitud de potenciales efectos subletales de la exposición a nanomateriales sobre el desarrollo embrionario de vertebrados, como la tasa de eclosión o la prevalencia de malformaciones (ver Figura 3). Este hecho es especialmente relevante ya que es bien conocido que organismos en diferentes estadios de desarrollo presentan diferente susceptibilidad a la toxicidad de los compuestos, pudiendo ser las formas embrionarias especialmente sensibles. Por otra parte, el que los embriones sean transparentes permite estudiar *in vivo* la entrada y distribución de los nanomateriales, así como la interacción de los mismos con el corion que protege el embrión y, una vez internalizadas, con las estructuras en desarrollo (ver Figura 4).



**Figura 3.-** Embriones de pez cebra de 120 horas post-fertilización. **A:** Embrión control desarrollándose normalmente. **B:** Embrión expuesto a 0.5 mg Cu/L de nanopartículas de CuO. El embrión no ha eclosionado y se pueden apreciar agregados de nanopartículas en la superficie del corion. Además, presenta edema del saco vitelino. **C:** Embrión expuesto a 0.5 mg Cu/L de nanopartículas de CuO. El embrión ha eclosionado y presenta varias malformaciones como edema del saco vitelino y curvatura de la espina dorsal.

Los peces cebra también ofrecen numerosas ventajas para la realización de experimentos de exposición *in vivo* de organismos juveniles y adultos que permiten profundizar en los mecanismos de toxicidad de los nanomateriales. En comparación con otras especies de peces de agua dulce como las carpas o las truchas, modelos también en Toxicología Ambiental, los peces cebra

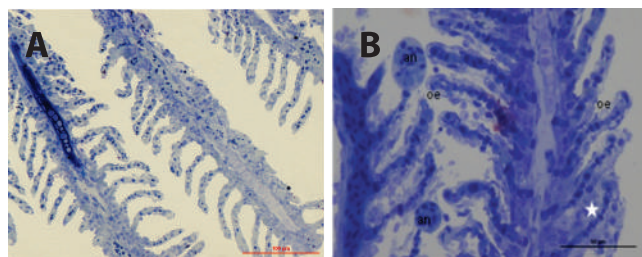
adultos son considerablemente más pequeños, lo que facilita la infraestructura de experimentación en cuanto a espacio y volumen de agua requeridos y, por tanto, cantidad del material a analizar.



**Figura 4.-** Microscopía confocal de embriones de pez cebra expuestos a 100 mg/L de nanopartículas de dióxido de silicio fluorescentes. **A:** Las nanopartículas de dióxido de silicio se encuentran adheridas al corion del embrión no eclosionado a las 54 horas post-fertilización. **B:** Embrión eclosionado de 120 horas post-fertilización con nanopartículas de dióxido de silicio en las laminillas branquiales.

Resultados obtenidos en nuestro grupo de investigación y por otros investigadores demuestran que el pez cebra adulto es sensible a la exposición a nanomateriales a través del agua. La exposición de peces cebra adultos a diferentes tipos de nanopartículas metálicas resulta en la acumulación de dichos metales y en la generación de respuestas y efectos a diferentes niveles de organización biológica, que abarcan desde la alteración del transcriptoma hepático, a la aparición de alteraciones histopatológicas en las branquias (ver Figura 5). Como especie modelo, el genoma del pez cebra está secuenciado y se dispone de microarrays de genoma completo que permiten estudiar simultáneamente los niveles de transcripción de casi 44.000 secuencias génicas. Los mecanismos de toxicidad de los nanomateriales son variados y dependen de las características propias de cada nanomaterial, pero la generación de estrés oxidativo, las respuestas inflamatorias y el daño sobre el DNA (genotoxicidad) parecen ser mecanismos comunes para la mayoría de los nanomateriales. Estos efectos también se han observado tras la exposición a metales en forma soluble, pero el estudio del transcriptoma hepático demuestra que la exposición a nanopartículas metálicas regula la expresión génica de forma diferencial a como lo hacen las sales metálicas en disolución. Nuestros resultados muestran, por ejemplo, que la exposición de peces cebra macho a nanopartículas de plata a través del agua altera de forma general el metabolismo energético de los peces. En las exposiciones a través del agua, las branquias parecen ser un

órgano diana de la exposición a nanomateriales, e incluso a concentraciones de microgramos por litro son capaces de causar patologías severas (ver Figura 5), que incluyen inflamación y fusión de las laminillas branquiales, hiperplasia y aneurismas.



**Figura 5.-** Micrografías de secciones histológicas de las branquias de pez cebra adultos. **A:** Estructura de las laminillas branquiales de peces control no expuestos. **B:** Estructura de las laminillas branquiales de peces expuestos a 10 µg/L de nanopartículas de Ag. Nótese las alteraciones en las laminillas secundarias como los aneurismas (an), edema de las células epiteliales (oe) y fusión de las laminillas (estrella blanca).

Teniendo en cuenta la tendencia de las nanopartículas a agregarse entre ellas y a la materia orgánica en suspensión, la contaminación de los organismos acuáticos a través de la dieta es una ruta de exposición que merece ser estudiada en profundidad. En este caso también, el pez cebra es un excelente modelo para simular una cadena trófica sencilla en el laboratorio, ya que una de las dietas preferidas de los peces cebra y habitualmente utilizada en los laboratorios es la alimentación con larvas de crustáceos pequeños como *Artemia* sp. y *Daphnia* sp. Nuestros resultados más recientes indican que la alimentación de peces cebra con crustáceos, previamente contaminados con nanopartículas metálicas, resulta en una transferencia efectiva del metal a los peces capaz de provocar efectos subletales (Fanjul, 2014).

Además de los efectos a corto plazo que se ha demostrado que ocurren tras la exposición a diferentes tipos de nanomateriales, queda un largo camino que recorrer para investigar los efectos que pudieran producirse a más largo plazo, por ejemplo bajo una exposición crónica a concentraciones en los límites de detección de las técnicas analíticas actuales. Estos efectos podrían aparecer en los propios individuos expuestos o en las siguientes generaciones. También en este caso, los peces cebra son un modelo muy interesante debido a su corto ciclo de vida, ya que alcanzan la madurez sexual en aproximadamente cuatro meses, lo que permite estudiar los efectos sobre varias generaciones en un periodo aproximado de dos años.

En conclusión, el pez cebra, tanto en su fase embrionaria como en estadios juveniles/adultos, ofrece numerosas ventajas como modelo animal para avanzar en el conocimiento de los efectos tóxicos de los nanomateriales y para proporcionar la base científica necesaria para la evaluación del riesgo asociado a la utilización de estas sustancias, contribuyendo así a la regulación de su uso.

### BIBLIOGRAFÍA

- Donaldson K., Stone V., Tran C.L., et al. *Nanotoxicology*. *Occup Environ Med* 2004, 61:727-8.
- Fako V.E. and Furgeson D.Y. *Zebrafish as a correlative and predictive model for assessing biomaterial nanotoxicity*. *Adv Drug Deliv Rev* 2009, 61:478-86.
- Fanjul A. *Acute toxicity, bioaccumulation and effects of dietary transfer of silver from Artemia exposed to PVP/PEI coated silver nanoparticles to zebrafish*. Tesis fin de máster, 2014. Máster europeo en medio ambiente y recursos marinos. Universidad del País Vasco/ Euskal Herriko Unibertsitatea.
- Lammer E., Carr G.J., Wendler K., et al. *Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (Danio rerio) a potential alternative for the fish acute toxicity test?* *Comp Biochem Physiol* 2009, 149C:196-209.
- OECD *Guidelines for the testing of chemical*. OECD 1992, TG 203: Fish, acute toxicity test.
- OECD *Guidelines for the testing of chemicals*. OECD 2013, TG 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test.
- Spitsbergen J.M and Kent M.L. *The state of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology: research-advantages and current limitations*. *Toxicol Pathol* 2003, 31:62-87.
- Vicario-Parés U., Castañaga L., Lacave J.M., et al. *Comparative toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, ZnO, TiO<sub>2</sub>) to developing zebrafish embryos*. *J Nanopart Res* 2014, 16:2550.

Lechos Premium para  
Animales de Laboratorio



# LIGNOCEL®

Eficacia, fiabilidad y  
trazabilidad aseguradas.



Calidad superior certificada acorde  
ISO, HACCP, PEFC y EnMS

Travesera de Gracia 56, 2º2ª  
08006 Barcelona  
Tel. 933 262 888  
e-mail: info@jrsiberica.com

RETENMAIER IBÉRICA  
S.L. Y CIA. S. COM.



Fibras diseñadas  
por la naturaleza  
Una compañía del grupo JRS

# Administración de fármacos por vía oral mediante gelatina en el pez cebra

**Marc Casanovas Gilabert**

Técnico del estabulario de acuáticos del PRBB, Charles River

### Introducción

El pez cebra (*Danio rerio*) es un pez tropical de agua dulce, originario de Asia y que actualmente está creciendo con fuerza dentro del campo de la investigación gracias, entre otras peculiaridades, a su gran poder de regeneración de órganos y tejidos. Además, se utiliza también en muchos otros campos como los estudios genéticos o la toxicología.

A diferencia de los roedores, en los que la medicación por vía oral se puede administrar tanto en pienso como en agua, en los animales acuáticos aparecen diversas complicaciones cuando hay que tratarlos debido al propio medio en el que viven; si añadiésemos el fármaco directamente en su cubeta, éste enseguida se disolvería en el agua, como pasa por ejemplo con el azúcar o la sal.

Otra opción para poderlos medicar es realizar baños con concentraciones conocidas, en los que los peces absorberían el fármaco por vía tópica. En este caso, no se puede asegurar la dosis del producto que se absorbe; además, al tener que cambiarlos de tanque varias veces para no contaminar el agua del sistema de recirculación, les provocaríamos un gran estrés, ya que estos animales deben manipularse lo menos posible.

Otra opción útil es el uso de piensos medicados. El principal inconveniente es su elevado coste y las producciones mínimas requeridas por los proveedores, por lo que no suele ser una alternativa viable a menos que vayamos a tratar a una gran cantidad de peces y durante un largo período de tiempo, previamente previsto y anticipado con stocks de pienso a nuestra disposición que no sobrepasen la fecha de caducidad.

Una forma más económica, pero igual de segura, que garantiza una correcta dosificación del fármaco y además minimiza el estrés generado en el animal, es la administración por vía oral mediante gelatina.

### Material necesario (ver Figura 1):

- Pinzas de punta redonda.
- Guantes.
- Probeta.
- Vaso de precipitado.
- Placa calefactora.
- Espátulas.
- Agitador magnético.
- Pipeta de volumen variable.
- Puntas para pipeta.
- Parafilm.
- Balanza.
- Fármaco que se vaya a administrar.
- Gelatina comercial.
- Enriquecedor y potenciador de sabor (Selco®).
- Agua osmotizada.



Figura 1.- Material necesario para la preparación de la gelatina.

### Procedimiento

**1. Preparación de la gelatina tratada:** según las instrucciones del fabricante, la gelatina obtenida sería de consistencia muy débil y no aguantaría mucho tiempo antes de que se deshiciese; por lo tanto, para que tenga más consistencia y densidad, se debe doblar la cantidad de gelatina en proporción al agua necesaria.

- a) Calentar agua en la placa calefactora. Cuando rompa a hervir, se añade la gelatina y se retira el recipiente de la placa calefactora. Sin parar de remover con la ayuda de una espátula añadiremos un enriquecedor, necesario para hacer que la gelatina sea apetecible para los peces ya que ésta es transparente e insípida. En nuestro caso utilizamos Selco®, que se emplea para alimentar a las artemias (crustáceo braquiópodo). Este enriquecedor tiene un gusto y un olor muy fuerte que consigue llamar la atención del animal. Se sigue removiendo y, cuando esté bien homogeneizada, se añade el fármaco o producto en cuestión a la concentración requerida.



**Figura 2.-** Comparación del tamaño de la granulometría del pienso de peces adultos (derecha) con respecto a la gelatina solidificada a administrar (izquierda).

- b) Con la ayuda de la pipeta, se depositan unas gotas sobre un parafilm y se dejan enfriar. Para poder dosificar el fármaco correctamente, cada gota tendrá que tener un volumen dado en relación al peso del pez a tratar. Es muy importante respetar la granulometría adaptada al tamaño de los peces (ver Figura 2), y así poder administrar tantas tomas de gelatina como se necesite.

2. **Desarrollo del hábito:** es aconsejable habituar a los animales a ingerir gelatina unos días antes de empezar con la medicación. Para ello, se tendrán que aislar en tanques individuales y asegurarse de que todos la ingieren sin problemas (ver Figura 3). Deberán seguir separados hasta la finalización del tratamiento.



**Figura 3.-** Sistema de recirculación de agua en tanques de pez cebra individualizados y marcados según la ingesta del tratamiento.

3. **Administración de la gelatina:** con suavidad, para no asustar al pez, abriremos la tapa del tanque y con ayuda de unas pinzas tomaremos una de las gotas solidificadas de gelatina que depositaremos en la superficie del agua. Con las mismas pinzas, realizaremos suaves movimientos agitando la superficie del agua, como si se tratara de un insecto, captando así la atención del animal (ver Figura 4). Hay que destacar que el pez cebra es un depredador de superficie con una boca ínfera, que le permite cazar cualquier insecto que se encuentre encima del agua.

A continuación, se cierra el tanque evitando dar golpes para no asustar al animal y se espera hasta confirmar que ingiere la gelatina sin ningún problema.

Cada vez que ingieran gelatina, se marcará el tanque con un trozo de cinta de color rojo; y cuando ingieran tres días consecutivos, se hará una marca distinta de color blanco (ver Figura 3) hasta completar todo el tratamiento.

## Técnicas

La administración por vía oral mediante gelatina tratada es una técnica que requiere mucha paciencia, pero sin duda es más económica que el uso de pienso medicado, permitiendo tratar de manera individualizada a los animales.



**Figura 4.-** Secuencia de imágenes en las que se muestra el proceso de administración de la gelatina: en la parte superior de cada imagen se observan las pinzas en agitación, estimulando el instinto depredador del pez cebra hasta que se acerca a la superficie a comerse la gelatina.

### Agradecimientos

Quiero agradecer a Juan Ramos y a Nolasc Puig su ayuda en la redacción de este artículo, pero sobre todo su paciencia.



sociedad española  
para las ciencias  
del animal de laboratorio

PRINCIPIOS ÉTICOS EN  
INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA  
CON MODELOS ANIMALES

5

SE DEBE UTILIZAR  
EL MÍNIMO NÚMERO DE ANIMALES  
QUE GARANTICE RESULTADOS  
EXPERIMENTALES  
ESTADÍSTICAMENTE FIABLES.



[www.secal.es](http://www.secal.es)



**Dietas**  
**Lechos y Virutas**  
**Jaulas y Racks**  
**Sistemas acuáticos**

**Equipos**  
**Enriquecimiento**  
**Distribución**  
**Soporte técnico**

# Gestión de alarmas en animalarios. Un caso práctico

**Daniel Lázaro García y Luis J. Muñoz de la Pascua**  
*S.E.A., Universidad de Salamanca*

## Introducción

El mantenimiento de las instalaciones donde se ubican animales para experimentación requiere de un control exhaustivo de los parámetros ambientales, así como de otros muchos factores que pueden incidir indirectamente sobre los animales a causa del mal funcionamiento de equipos o infraestructuras de diversa índole.

El aumento significativo en las últimas décadas de equipos de estabulación con ventilación forzada (racks ventilados), ha introducido, más si cabe, la necesidad de tener vigiladas en todo momento las desviaciones críticas en parámetros ambientales, que puedan surgir de forma accidental y sean capaces de ocasionar graves daños sobre la salud de los animales.

Desde un punto de vista práctico, el sistema de alarmas deberá estar dirigido al control de parámetros vitales y situaciones críticas que puedan ser más comunes en el animalario, y sobre todo en períodos en los que no existe actividad laboral, como durante la noche o fines de semana. Así, las alarmas de incendio, junto con el control de parámetros como la temperatura, humedad e interrupción de la ventilación, son los elementos principales a tener en cuenta. Por otra parte, no podemos obviar el control de incidencias relativas a equipos de refrigeración u otros, que por seguridad para el personal, o por el valor de las muestras almacenadas, también sea de importancia vital.

Nota aparte la constituyen las alarmas de incendios, para las que existe una legislación específica (RD 2177/1996; RD 393/2007, de 23 de marzo), que nos obliga a contar con un plan de autoprotección, así como con una serie de detectores, alarmas y medios de control (extintores) de estas situaciones. A pesar de ello, en algunos de nuestros campus universitarios o centros de investigación, no existe siempre una coordinación para la gestión de dichas alarmas, por lo que tendremos que ser nosotros, los que

implementemos el procedimiento por el que nos será comunicada dicha circunstancia cuando no haya presencia de personal en las instalaciones. En el resto de casos, la monitorización de las incidencias críticas que se produzcan fuera del horario laboral dependerá del grado de informatización del edificio y del personal de seguridad (si existe).

En el presente artículo, expondremos la solución adoptada en un animalario en el que se implementará un sistema de gestión de alarmas a través de mensajes de texto de telefonía móvil (SMS).

## Antecedentes y metodología

La actuación reflejada se produce en primera instancia, sobre un animalario para ratones íntegramente estabulados en microaisladores ventilados. El animalario cuenta con 28 unidades de ventilación de racks, repartidos en 10 salas. Durante la puesta en marcha del animalario, se planteó la necesidad de contar con un punto de control centralizado para visualizar el estado operativo de todas estas unidades. Con los medios y personal disponible, se optó por utilizar las líneas libres preinstaladas de cableado telefónico de cada sala, conectando a cada línea el contacto de alarma de cada unidad de ventilación. Inicialmente y como solución de bajo coste, se instaló una batería de relés con leds incorporados, conectados por cable telefónico a los relés de alarma de las unidades de ventilación de racks. La batería de relés se instaló en un panel situado en el despacho de mantenimiento, siendo fácil detectar por las señales luminosas si alguna de las unidades de ventilación fallaba, sin necesidad de ir sala por sala verificando el estado de los motores.

El uso generalizado de la telefonía móvil y la disponibilidad de sistemas modulares de gestión de mensajes vía SMS, junto al bajo coste inicial, nos animó a intentar mejorar el sistema descrito (panel de leds), que requerían un control presencial, hacia el tipo de módulos telemáticos, implementando además nuevas funcionalidades, como el control de funcionamiento de los climatizadores.

Cada módulo GSM/GPRS, en función del modelo elegido,

cuenta con un mayor o menor número de entradas y salidas, tanto analógicas como digitales, que permiten el control de varios equipos simultáneamente. A estas entradas se pueden conectar una gran variedad de sensores (termostatos, higrómetros, fotocélulas, sensores de caudal, presostatos, etc., o cualquier componente que cuente con un simple contacto eléctrico). De igual modo, el módulo permite activar salidas digitales por relé, a través de órdenes por SMS o de forma programada, lo que puede ser también de mucha utilidad para activar equipos auxiliares, avisadores acústicos o luminosos, etc.



Figura 1.- Módulo GSM/GPRS (Hermes TCR-120 -Microcom, Irún, España).

El módulo instalado (ver Figura 1) cuenta con 4 entradas analógicas, 8 digitales y 4 salidas digitales, programables mediante un software propietario a través de conexión al PC (Microsoft Windows). Además, debe ser complementado con una tarjeta SIM de telefonía móvil y situado en una zona con cobertura GSM. Al mismo, se deben conectar mediante cableado, los distintos componentes (sondas o contactos eléctricos) de los equipos que queremos monitorizar (ver Figura 2).

Para gestionar las alarmas, dividiremos las incidencias, que deberán programarse en el módulo, en dos categorías según su gravedad:

1. **Aplazables:** aquellas cuyas consecuencias sobre el bienestar de los animales o sobre los equipos monitorizados no produzcan consecuencias graves en el plazo de de 48 horas. Estas incidencias se determinan, en general, dependiendo del grado de desviación de los parámetros ambientales, o de desviaciones en el aporte de



Figura 2.- Esquema de los componentes conectados al módulo GSM/GPRS.

calor o frío de los sistemas primarios. Por ejemplo, una desviación de  $\pm 2^{\circ}\text{C}$  en temperatura de las celdas.

2. **Críticas:** aquellas en las que sea preciso intervenir en un plazo menor de 24 horas. Por ejemplo, las paradas del suministro de ventilación, alarma de incendio, desviaciones grandes de temperatura, corte del suministro eléctrico, etc.

El modo de actuación en función de las incidencias quedará recogido en un Protocolo Normalizado de Trabajo (PNT), de forma que se recoja en la programación de los módulos el tipo de mensaje de texto (ver Figura 3), y las personas a las que se enviará el mensaje, que serán responsables de las decisiones posteriores.

### Discusión y conclusiones

En el mercado encontramos sistemas comerciales de gestión de alarmas de utilidad para nuestras instalaciones fundamentalmente a dos niveles. Por un lado, los sistemas telemáticos de gestión de instalaciones, que suelen adoptarse durante la fase de ejecución de la obra civil, y por otro, los sistemas de gestión de

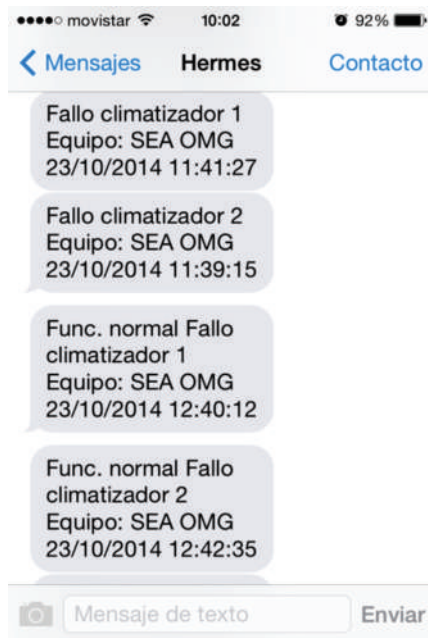


Figura 3.- Ejemplos de mensajes de texto.

alarmas para racks ventilados, que ofertan los principales fabricantes del sector.

En ambos casos, los sistemas ofertados tienen un valor económico alto, siendo necesario evaluar la relación coste-beneficio a la hora de tomar la decisión de compra. Indudablemente, el disponer de una herramienta tan útil para tomar medidas ante situaciones de emergencia, nunca debería ser tomada como prescindible dadas las consecuencias sobre los animales, pero desafortunadamente, el nivel de implantación de estas alarmas no es algo muy común en la actualidad en los animalarios, bien por la falta de recursos económicos, o por falta de información o interés de los órganos jerárquicos responsables.

El sistema que hemos presentado aquí constituye una tercera vía de gestionar nuestras necesidades sin contar con un hardware y un software costoso, siendo sólo necesaria una instalación menor (cableado y conexión a los distintos componentes a controlar).

En nuestra experiencia, el sistema de módulos GSM detallado, ha demostrado con creces su fiabilidad desde su instalación hace 9 años, constituyendo un elemento muy útil en base a su coste. Actualmente, contamos con cuatro módulos, que

monitorizan la práctica totalidad de los equipos críticos en los animalarios dependientes del S.E.A. Así, estos sistemas pueden ser un recurso a tener en cuenta en la mejora de nuestras instalaciones, proporcionándonos un control permanente y muy valioso en la vigilancia de la salud y el bienestar de los animales, además de informarnos sobre posibles desviaciones de los parámetros ambientales, que pueden interferir con las investigaciones en curso.

#### BIBLIOGRAFÍA

- *Animal Research Facility Solutions*. 2008 by Siemens Building Technologies, Inc.
- *CCAC guidelines on: laboratory animal facilities - characteristics, design and development*, 2003.
- *IACUC Policy, Animal Facilities*. University of Pennsylvania. Office of regulatory affairs.
- *Microcom*. Sistemas modulares S.L. Irún. Guipúzcoa – España. [www.microcom.es](http://www.microcom.es).

**TÚ TAMBIÉN  
PUEDES SER  
PARTE DE  
LA SECAL**  
¡HAZTE SOCIO!

[www.secal.es](http://www.secal.es)





Granja  
San  
Bernardo

*Minimal Disease  
Level Rabbits*

New Zealand White Rabbit.  
Total absence of all important rabbit disease germens  
with specific sanitary garantees.

Ask our most recent garantee table at  
[www.granjasanbernardo.com](http://www.granjasanbernardo.com)

# Complejidad

### Javier Fidalgo

Socio-director en Ocelata consultores

La empresa IBM publica cada dos años unas conclusiones basadas en una amplia encuesta que realiza a directivos de todo el mundo. Hace cuatro años lo tituló *Liderar en la Complejidad*<sup>1</sup>.

En ese informe se lee: *Mientras ocho de cada diez directores generales prevén una complejidad importante en el futuro, menos de la mitad se ven preparados para gestionarla*<sup>2</sup>.

La complejidad como descripción del “nuevo entorno” en el que trabajamos, como dificultad a la que debemos hacer frente, etc. aparece cada vez en más artículos y libros sobre gestión<sup>3</sup>, la mayoría de las veces al principio, advirtiendo de cuánto ha cambiado el mundo laboral y empresarial. El término se refiere, entre otras cosas, a que cada vez es más difícil predecir cómo será nuestro trabajo el próximo mes: si seguiremos trabajando donde lo hacemos, cómo y con quién lo hacemos, incluso ¡si nuestra empresa seguirá existiendo!

En efecto, la imprevisibilidad es una de las características de los llamados sistemas complejos de los que parece ser formamos parte.

En realidad, la creciente incertidumbre que nos parece novedosa parece haber sido lo normal a lo largo de la historia. Aunque ahora con razón nos desasosiegue lo inseguro del mundo laboral, durante mil años y hasta hace bien poco, en Europa, nadie tenía la seguridad de seguir con vida a tres meses vista. Dice M. Livi-Bacci<sup>4</sup> que hasta mitad del siglo XVIII la muerte tenía un alto componente aleatorio e impredecible. Causas diversas, como las

grandes epidemias de peste, segaban la vida de personas de todas las edades y condiciones.

En mi caso, un texto literario que sirve para dudar de la normalidad de la sosegada certidumbre de nuestra época, es el primer capítulo del libro *Un Mundo de Ayer* de Stefan Zweig. El autor describe cómo a finales del siglo XIX, en Austria, millones de personas compartían la certeza de que la civilización había alcanzado su máximo histórico. Nada ni nadie podía alterar el bienestar alcanzado, sólo cabía seguir progresando. La edad de oro de la seguridad. Y luego, todo resultó ser un castillo de naipes<sup>5</sup>.

Existe una corriente de pensamiento que sugiere que los humanos formamos sistemas complejos. Tan complejos que economistas, psicólogos, sociólogos y antropólogos siguen sin ser capaces de predecir nuestro comportamiento<sup>6</sup>. Las organizaciones, en tanto formadas por personas, son sistemas complejos cuyo comportamiento es igualmente difícil de predecir. Esa corriente sugiere no defenderse de la complejidad e incertidumbre asociada, sino aceptarla y manejarla.

Más allá de constatar que el mundo ha cambiado en esa dirección, ¿qué tiene de ventajoso considerar nuestro entorno laboral como un sistema complejo?

Desde mi punto de vista, la *perspectiva de la complejidad* se ajusta más a mi propia experiencia y observación. La idea básica que esa perspectiva propone es que los elementos que forman una organización, las personas, son agentes únicos, diferentes entre sí, cada uno con una historia, formación e información distintas y cambiantes en cada momento. Cada uno de los agentes influye en los demás y es influido por el resto. Por si fuera poco, esta situación se está actualizando, cambiando constantemente, y nuevos resultados, información, acuerdos, concepciones y formas de cooperar emergen de forma imprevisible e inesperada en cada interacción.

Esta descripción, repito, se ajusta más a la realidad que otra, más extendida, según la cual las organizaciones son entidades

<sup>1</sup>IBM (2010). *Liderar en la Complejidad*. Recuperado de: [http://www-05.ibm.com/services/es/cio/pdf/GBE03362-ESES-00\\_HR.pdf](http://www-05.ibm.com/services/es/cio/pdf/GBE03362-ESES-00_HR.pdf)

<sup>2</sup>Puede que en esta expresión se esté utilizando el término complejo como sinónimo de complicado. En este artículo no los consideramos sinónimos. Para ver la diferencia, ver: Goldstein J., Hazy J.K., Lichtenstein B.B. (2010). *Complexity and the nexus of leadership*. Ed. Palgrave. Macmillan.

<sup>3</sup>Supongo que llegará un momento que, aceptada como algo normal por las nuevas generaciones, dejará de aparecer tanto.

<sup>4</sup>Livi-Bacci M. (1990). *Historia mínima de la población mundial*. Barcelona: Ariel, S.A.

<sup>5</sup>Zweig Stefan (2001). *El mundo de ayer: memorias de un europeo*. Ed. Acantilado

<sup>6</sup>Salvo en algunas pocas situaciones y muy corto espacio de tiempo.

donde los resultados son siempre predecibles si el agente aprieta la tecla adecuada.

Esta segunda forma más extendida de entender el mundo, nuestra forma de actuar y relacionarnos, es una de *relaciones causales simples*. Los acontecimientos que percibimos tienen una causa y el nexo con los efectos que producen es tan directo y sencillo que con facilidad imaginamos su relación.

Por ejemplo, si necesito que mi departamento genere nuevas ideas para solucionar cierta situación, la perspectiva “simple” supondrá que celebrando una reunión al respecto (causa) obtendré la nueva idea necesaria (efecto). Desde una perspectiva “compleja”, el resultado de una reunión como ésta es impredecible (no podremos asegurar que la idea producida sea suficientemente buena) y, en cambio, propone estimular los espacios de interacción entre personas en los que se produzcan ideas valiosas inesperadamente (como de hecho suele suceder), y que esté prevista la canalización de esa valiosa información emergida para su utilización en beneficio de la organización (como de hecho no suele suceder). Desde esta perspectiva, el lugar en que puede emerger información valiosa es imposible de prever, podría ser en una reunión, en un pasillo, frente a la máquina de café, en una conversación en un *chat*, etc. Los directivos, sugiere esta perspectiva, deben proveer y cuidar de las condiciones *ambientales* que faciliten las interacciones entre agentes que provoquen el nacimiento de novedades.

A pesar del aparente consenso sobre que el mundo se ha complicado y su complejidad se ha hecho más evidente, y a pesar de que notamos algunos de sus efectos desagradables, nuestra forma de entender ese mismo mundo y actuar en él parece no haberse modificado.

A mi juicio, mantenemos una tenaz forma de ver sólo bajo el prisma de la simplicidad causal. Ésta, además de otros orígenes, se alimenta, me parece, de nuestra experiencia cotidiana. Por todas partes y continuamente, durante un día normal, se manifiestan relaciones causales explícitas y visibles: aprieto el interruptor y se enciende la luz de la sala; el semáforo se pone verde, pongo en movimiento el coche; si sigo el procedimiento aprendido, al apretar una tecla el cajero del banco me entregará el dinero que necesito; si mi jefe no actúa como yo espero es porque me tiene manía o no sabe dirigir, etc<sup>7</sup>.

<sup>7</sup>Este último ejemplo es de diferente categoría que los precedentes, aquí la relación puede no ser real, lo he incluido porque aún imaginada, a menudo esa relación causal es vivida como si fuera del todo objetiva.

Esta continua impresión que nos cala sin enterarnos es subrayada también constantemente desde los medios de comunicación con noticias científicas que destacan ese tipo de relación causal<sup>8</sup>. Estos mensajes tienen una gran fuerza adoctrinadora en tanto su carácter científico lo legitima a ojos y oídos de la gran población leiga. Quizás sea precisamente por su sencillez por lo que las ideas que exhiben esa relación, las únicas capaces de ser entendidas por el gran público, sean escogidas por los redactores de los periódicos y revistas de mayor tirada.

Por ejemplo, es posible escuchar y leer periódicamente la proposición reduccionista de que todo comportamiento humano se explica, o llegará a explicarse, descifrando cierta secuencia genética. Todo está en los genes. No sugiero que esas proposiciones científicas estén equivocadas, lo que quiero destacar es que parecen las únicas que son difundidas por los medios de comunicación.

Algo parecido ocurre con la ingente cantidad de artículos escritos bajo ese prisma de causalidad simple y que se identifican fácilmente a través de la forma de titular: *Las 5 claves para aumentar tu inteligencia emocional*<sup>9</sup>.

Una variante de lo anterior, que combina ciencia y divulgación, toma la forma de convertir una idea científica en algo falso pero *pret a porter* para el gran público que, simplificado, lo mitifica y extiende.

Seguro que usted ha oído algo sobre las distintas formas de aprender y expresarnos que tenemos las personas según

<sup>8</sup>Sin llegar a los deportes, la ciencia es una de las más constantes entre las diez o doce categorías mostradas en la portada de muchos de los periódicos generalistas de mayor difusión en internet. Ver por ejemplo, el Frankfurter Allgemeine, The New York Times, The Independent, Daily Mail, El Mundo, Le Monde, El Confidencial, El País, Corriere della Sera (información cotejada el 28 de noviembre del 2014).

<sup>9</sup>El 16 de septiembre del 2014 tardé 8 min. 26 sg en encontrar en Internet y recopilar de ocho *websites* distintas los siguientes títulos de artículos: *Las 12 cosas que transforman exitosamente una gran idea en algo tangible*; *5 claves para aumentar tu inteligencia emocional*; *7 Formas en que la generosidad pueden conducir al éxito*; *Felicidad Laboral: 5 claves psicológicas que potencian la motivación*; *Los 15 rasgos del empleado ideal*; *11 razones por las que la gente se siente incómoda liderando*; *Las 10 principales características de un buen trabajador en equipo*; *4 maneras de dedicarte a vivir tu vida*; *Los 10 mandamientos para interpretar el lenguaje corporal*; *10 Principios de buenas comunicaciones corporativas internas*.

No sólo se trata de una forma de usar el título como recurso para atraer la atención e inducir a la lectura. En todos estos casos, y la mayoría de artículos de este tipo que sigo leyendo, presuponen un tipo de relación causal directa y simple entre lo que se pretende conseguir y la acción recomendada. Que los autores creen lo que escriben es otro asunto, aquí quiero destacar el bombardeo constante del modelo de causalidad simple al que estamos sometidos.

## Factor Humano

predomine en nosotros la actividad cerebral derecha o la izquierda. En los “izquierdos” predomina el pensamiento lógico, analítico. Los “derechos” tienen facilidad para ver las cosas en su conjunto, mentes artísticas. Pues es mentira<sup>10</sup>. De nuevo, compramos con más facilidad la idea equivocada de una relación simple entre una parte anatómica delimitada y unos efectos concretos que la compleja y, según parece, más acertada, de que “la función no está atada a un área, es el producto de una red celular distribuida por el cerebro a través de lóbulos y hemisferios<sup>11</sup>”.

A lo anterior cabe sumar las experiencias en el trabajo. Una característica de la vida en las organizaciones es la omnipresencia de datos: ventas diarias; gastos mensuales; errores por envío; objetivos conseguidos; nivel de competencia alcanzado; etc. Existen indicadores para casi todo<sup>12</sup>. La mayoría de esas mediciones y datos mantienen una relación causal simple con los acontecimientos de los que informan. Como he dicho antes, no quiero sugerir que los indicadores y datos no sean imprescindibles para gestionar la empresa, sólo quiero llamar la atención sobre su posible contribución a la construcción subjetiva de nuestra imagen del funcionamiento del mundo.

Por último, puedo suponer que en organizaciones dedicadas a producir ciencia basada en el método científico experimental, la necesidad esencial de aislar y estudiar la relación entre unas pocas variables puede imbuir a quienes trabajen en ella de una forma de ver las cosas en la que predomine este tipo de relación causal. ¿Qué consecuencias puede tener todo lo anterior?

Creo que esta omnipresencia de la *relación simple* puede inducirnos a extender una percepción de simplicidad causal a dominios en los que no sólo no sirva de nada, sino que nos confunda al analizar la información disponible y desorienta en la toma de decisiones.

---

<sup>10</sup>Mendez R. (16 de agosto 2013). Desmontando el mito de “cerebro-izquierdo”, “cerebro-derecho”. Recuperado de: <http://www.mediciencia.com/desmontando-el-mito-de-cerebro-izquierdo-cerebro-derecho/>

Sobre “neuromitos” tomados como verdad con consecuencias prácticas en la educación se puede leer: Howard-Jones Paul A. *Neuroscience and education: myths and messages*. Nature Reviews Neuroscience, 15 817-824 (2014). Recuperado de: [http://www.nature.com/articles/nrn3817.epdf?referrer\\_access\\_token=PLGGpGzLBW9i](http://www.nature.com/articles/nrn3817.epdf?referrer_access_token=PLGGpGzLBW9i).

<sup>11</sup>Sukel K. *Can We Quit It With the “Right Brain, Left Brain” Stuff Already?!*. Recuperado de: <http://bigthink.com/world-in-mind/can-we-quit-it-with-the-right-brain-left-brain-stuff-already>

<sup>12</sup>Una máxima de la gestión de calidad es *lo que no se puede medir no existe*.

Es decir, podemos tender a buscar soluciones a problemas complejos<sup>13</sup> desde un esquema de causalidad simple. Así, buscamos una única causa que se cree produce el problema y con el que se relaciona de forma simple y lineal. Hallada la causa supuesta, encajamos lo que creemos es una solución. En estas condiciones, que acertemos a solucionarlo<sup>14</sup> es producto del azar.

Como dijo H.L. Mencken: *para cualquier problema humano existe una solución que es simple, elegante y equivocada*<sup>15</sup>.

Y aquí voy a parar porque ahora es cuando, cerrando el artículo, debería ofrecer una solución, siguiendo a Mencken, atractiva e inútil. No creo que exista. En el mundo hay relaciones simples y complejas, no son buenas o malas, son las que hay. De lo que sí estoy convencido es de que la eventual utilidad de este artículo, más allá de entretener, reside en la idea de que cuanto más conscientes seamos de las dimensiones invisibles que pueden estar influyendo en nuestra forma de pensar y actuar, mayor control tendremos sobre nuestras acciones y más acertadas serán nuestras decisiones.

---

<sup>13</sup>Por cierto que a este grupo suelen pertenecer muchos de los problemas a los que deben dar solución quienes manejan grupos o trabajan en equipo.

<sup>14</sup>A solucionarlo de verdad, no a eliminar momentáneamente sus efectos de forma que en apariencia el problema ha desaparecido cuando en realidad espera escondido bajo una alfombra la ocasión para volver a manifestarse.

<sup>15</sup>Recuperado de: [http://en.wikiquote.org/wiki/H.\\_L.\\_Mencken](http://en.wikiquote.org/wiki/H._L._Mencken)

International Product Supplies Limited



## Feeding the Innovations of Modern Research

- European Manufacture
- Used & Trusted in Facilities Worldwide
- Fast Flexible Lead Times
- Nutritional Expertise & Advice
- Traceability
- Quality Assurance
- Prompt Delivery
- Modern Technology

### *TestDiet*® Europe

- DIO High Fat Range
  - Fenbendazole
  - Doxycycline
  - Helicobacter
  - AIN Series
  - Tamoxifen
- [www.testdiet.com](http://www.testdiet.com)



### *LabDiet*

- All Species
- Meal
- Autoclavable
- Irradiated
- Extruded
- GLP

[www.labdiet.com](http://www.labdiet.com)



Also available to order  
in Spain and Portugal  
from IPS distributor:

#### **Sodispan Research S.L.**

C/ Isla de Tavira, 14  
28035 Madrid, Spain  
Phone: +34 629159613  
Facsimile: +34 914593962  
Email: [sodispan@sodispan.com](mailto:sodispan@sodispan.com)



### “Mi día a día”

¡Hola a todos los lectores de la revista “Animales de laboratorio”!

Soy Paloma García Potrero, cuidadora del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) y, a partir de este número, voy a llevar esta sección dirigida a todos los miembros de la SECAL y en especial, a mis compañeros, los cuidadores de los diferentes animalarios de la comunidad y del país. Aprovecho para saludar y agradecer a mis compañeros del CNIO por sus ánimos y por todo su apoyo. Espero entreteneros y servir de ayuda sobre cualquier tema que este en relación con nuestro mundo y en especial, con el trabajo que desarrollamos los cuidadores.

Me parece interesante, para irnos conociendo, que tengáis algunos datos sobre el trabajo que desempeño y como es mi día a día en el animalario.

Soy cuidadora desde el 2009 y mi función es valorar diariamente la evolución de las patologías de los ratones (en mi caso particular, puesto que en otros centros se trabaja con otras especies de animales) al tiempo que observo diferencias o anomalías posibles ante los ensayos de investigación, comunicando los resultados de mi valoración a mis compañeros, técnicos de animalario y ellos a su vez, completando la cadena informativa, a los diferentes laboratorios del centro.

Todos los días, llego a las ocho de la mañana, cojo mi tarjeta, y ficho por los tornos del centro y después por la entrada del animalario (el día que se me olvida la tarjeta es una faena, porque sin ella, no puedo acceder al animalario, ni dentro de barrera, ni a mis celdas asignadas...). Cuando entro por la puerta del animalario, lo primero que hago es dar los buenos días a mis compañeros que trabajan en el área de administración del animalario y seguidamente, me voy camino al vestuario que comunica con la Zona de Barrera en la que trabajo. En el vestuario, me desvisto para poder acceder a la primera esclusa donde me pongo un mono, unas calzas y un gorro, todo estéril por supuesto. En la segunda esclusa, me pongo los zuecos, la mascarilla, desinfecto la tarjeta y me la guardo, me desinfecto las manos, me pongo los guantes y entro a la tercera y última zona, la zona de las

duchas de aire (una ducha a veces placentera o a veces un poco incómoda, dependiendo de la temperatura del aire y de la época del año). Cuando ya terminan los 90 segundos que duran estas duchas, salgo y... ya estoy preparada para empezar mi jornada laboral.

**Tengo que decir, como anécdota personal, que la primera vez que entré al vestuario y me dijeron “aquí es donde os tenéis que quitar la ropa” y después de ver toda la parafernalia que tienes que hacer para acceder a barrera, mi cara de perplejidad era asombrosa, como os podéis imaginar.**

Una vez dentro de barrera, cada cuidador del centro tenemos unas celdas asignadas, en las que trabajamos en pareja y junto a un técnico de animalario, para los laboratorios que investigan en el CNIO. Estas celdas se cambian todas las semanas y se revisan diariamente. Cuando menciono la palabra “cambiar” me refiero a que cada celda tiene un día de la semana asignado, durante el que tenemos que revisar, una por una las cubetas, en mi caso de ratones, revisando uno por uno los ratones y comprobando su estado de salud, mirando patologías y valorando si ha empeorado o no en caso de que las tenga. Todas las cubetas tienen una tarjeta en la que los ratones están identificados y numerados y tenemos que comprobar que el número de ratones que hay en la tarjeta corresponde al número que hay en la cubeta.

Cuando todo esto es correcto, pasamos a los ratones a otra cubeta con viruta limpia, en la que ponemos enriquecimiento ambiental (comúnmente llamados “juguetes”) para intentar asemejar el ambiente de la cubeta con el de su entorno natural.

**Tengo que decir que, después de estar todo limpio, me encanta quedarme observando cómo construyen sus nidos y madrigueras, cómo olisquean y cómo se comportan estos pequeños compañeros de trabajo.**

Todo esto que os he contado, lo hacemos todos los días; revisamos los animales, al igual que su agua, comida y

enriquecimiento, ya que no les puede faltar de nada en ningún momento. Cuando todo esto se termina, nos salimos fuera de barrera, realizando todo el proceso de acceso a zona de barrera pero a la inversa, para preparar todo el material que hay que introducir dentro para su utilización, desde los juguetitos de los ratones, hasta nuestra ropa y EPIS, material de laboratorio, pienso, dietas especiales, etc. Y todo esto sería un día de un cuidador en el CNIO.

A parte de haceros ver y explicaros lo que es mi trabajo, también hay otra parte importante que es la satisfacción de trabajar en el CNIO o, dicho con otras palabras, lo que hace que todas las mañanas me levante para venir a trabajar.



Para mí, una de las cosas que hace especial este trabajo es poder trasladar los hallazgos y resultados clínicamente probados con ratones a la medicina en humanos, poniendo así nuestro granito de arena a la ciencia y a la mejora de la calidad de vida en enfermedades crónicas o graves, como es hoy en día el cáncer, entre otras muchas. Otra es la compenetración que puedes llegar a desarrollar con nuestros pequeños compañeros, los ratones. En este apartado también voy a incluir algunas opiniones de

## Al cuidado

compañeros en las que explican qué es lo que les motiva a trabajar en este mundo: por ejemplo, a Miriam lo que más la satisface es el buen trato que proporciona cada día a sus animales ya sea para un fin concreto o no; Guillermo dice que además proporcionar bienestar animal, ayuda poco a poco a mejorar nuestra calidad de vida; y Maribel y Victoria dicen que a ellas lo que más la satisface es que, da igual el tiempo que lleven trabajando con ratones, no dejan cada día de aprender cosas nuevas sobre su trabajo y sobre ellos.

Y hasta aquí la presentación de esta sección, esperando que os haya resultado amena, entretenida y que además, os haya acercado un poquito más a este tipo de trabajo, a mi día a día. Dar las gracias a Isabel Blanco, jefa de animalario del CNIO, por confiar en mí para desempeñar esta tarea y espero que éste sea el principio de un largo camino y podamos compartir muchas noticias, informaciones interesantes, anécdotas... y ni que decir que si hubiera algún tema por el que sintáis más curiosidad o que os interese más que otro, no dudéis en comunicármelo por correo ([pgarcia@srv.cnio.es](mailto:pgarcia@srv.cnio.es)). Seguro que podemos hablar un rato sobre aquello que tanto os inquieta.

# AL CUIDADO



Head office Castrop-Rauxel  
Hermannstraße 2-8  
44579 Castrop-Rauxel, Germany  
phone +49 (0) 23 05 9 73 04-0  
fax +49 (0) 23 05 9 73 04-44

Facility in Emmendingen  
Fabrikstraße 2  
79312 Emmendingen, Germany  
phone +49 (0) 76 41 92 65-0  
fax +49 (0) 76 41 47 97-2

Facility in Schönwalde  
Hauptstraße 61b  
16348 Wandlitz, Germany  
phone +49 (0) 3 30 56 8 13-11  
fax +49 (0) 3 30 56 8 13-12

**BIOSCAPE**  
E B E C O + E H R E T F U S I O N



## Full service lab animal technology

### Representante en España:

Mari Carmen Viso

E-Mail [maria-carmen.viso@bioscape.de](mailto:maria-carmen.viso@bioscape.de)

Teléfono + 34 6 55 76 38 28

Fax + 34 9 66 14 96 45

[info@bioscape.de](mailto:info@bioscape.de)



Cages, racks for conventional  
animal husbandry



Ventilated systems + IVC cages



Individual cages



Cage systems



Transport + accessories



Washing, cleaning +  
decontamination

## Evaluación de riesgos por manipulación de productos químicos: método simplificado

M<sup>a</sup> del Carmen García Ortiz<sup>1</sup> y Jesús Martínez Palacio<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Máster en Prevención de Riesgos Laborales

<sup>2</sup>Técnico Superior en Prevención de Riesgos Laborales

En nuestro campo, es común el uso de productos químicos, bien como parte de los procesos experimentales (toxicidad, metales...), bien como parte de rutinas higiénicas (desinfectantes, limpiadores...) o pautas médicas (anestésicos, fármacos...).

Los estudios demuestran que los productos químicos actúan normalmente por vía inhalatoria, lo que hace que la evaluación de estos riesgos pueda resultar compleja.

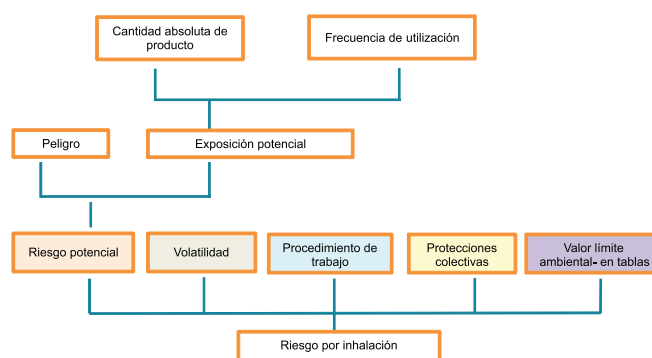
El Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT) publicó en 2011 el documento "Riesgo químico: Sistemática para la Evaluación Higiénica" que establece un procedimiento para la evaluación, de forma "simplificada", del riesgo por exposición/inhalación de agentes químicos en su manipulación.

Este procedimiento se basa en el establecido por el Institut National de Recherche et Sécurité (INRS) de Francia. El 'método simplificado' es, pese a su nombre, muy completo, ya que incluye etapas de jerarquización y de evaluación y además tiene en cuenta parámetros como el tipo de procedimiento y la ventilación.

Este procedimiento es fácil de aplicar, y se puede consultar y descargar en la página del INSHT:

<http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/CATALOGO%20DE%20PUBLICACIONES%20ONLINE/FOLLETOS/NOVEDADES%202011/Riesgo%20quimico%20para%20la%20evaluacion%20higienica/documento%20riesgo%20quimico.pdf>

La evaluación simplificada se realiza a partir de las variables que se muestran en la Figura 1, estableciendo para cada una, una



**Tabla 1.-** Esquema para la evaluación simplificada del riesgo por inhalación.

clase y una puntuación asociada a cada clase, que permitirá caracterizar el riesgo clasificándolo como riesgo a priori bajo, moderado y probablemente muy elevado.




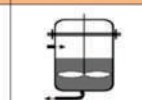
La **metodología** de evaluación consta de tres fases: Inventario de productos químicos y materiales utilizados, jerarquización de riesgos potenciales y evaluación de riesgos.

En la segunda fase, relativa a la jerarquización de riesgos, se establecen prioridades de actuación en función de los peligros y de la exposición potencial. La clase de peligro se establece a partir de las frases R o H. La exposición potencial viene determinada por la frecuencia y cantidad de producto químico utilizado. En esta fase se calcula el riesgo potencial de cada sustancia, y en función del mismo se establecen prioridades de evaluación por grupos de riesgo homogéneo.

En la tercera fase, se evalúan de forma simplificada los riesgos siguiendo el orden establecido en la jerarquización y teniendo en cuenta determinados parámetros en el caso de riesgo por inhalación como: los peligros de los agentes químicos, las propiedades físico-químicas (estado físico, volatilidad,...), las condiciones de uso (tipo de procedimiento, temperatura,...) y las medidas de control (ventilación).

**Propiedades físico-químicas:** La volatilidad o pulverulencia del agente químico le permite pasar al ambiente variando en función del estado físico. Para los sólidos se establecen tres clases de pulverulencia, mientras que para los líquidos existen tres clases de volatilidad, en función de la temperatura de ebullición y la temperatura de utilización del agente químico.

**Condiciones de uso:** Otro de los parámetros a considerar en la evaluación es el procedimiento de utilización del agente químico. En la figura 2 se muestran las cuatro clases de procedimiento establecidas y se dan algunos ejemplos de estos sistemas, el criterio para asignar la clase de procedimiento y su correspondiente puntuación.

Dispersivo	Abierto	Cerrado/abierto regularmente	Cerrado permanente
 <p>Ejemplos: Pintura a pistola, taladro, muebla, vaciado de sacos a mano, de cubos... Soldadura al arco... Limpieza con trapos. Máquinas portátiles (sierras, cepillos...)</p>	 <p>Ejemplos: Conductos del reactor, mezcladores abiertos, pintura a brocha, a pincel, puesto de acondicionamiento (toneles, bidones...), Manejo y vigilancia de máquinas de impresión...</p>	 <p>Ejemplos: Reactor cerrado con cargas regulares de agentes químicos, toma de muestras, máquina de desengrasar en fase líquida o de vapor...</p>	 <p>Ejemplos: Reactor químico.</p>
Clase 4	Clase 3	Clase 2	Clase 1
Puntuación de procedimiento			
1	0,5	0,05	0,001

**Tabla 2.-** Determinación de la clase de procedimiento y puntuación para cada clase

**Medidas de control:** Se establecen cinco clases de protección colectiva según se realice el trabajo en espacios con ventilación natural favorable o no, ventilación mecánica, bajo campana, cabinas...

Por último, se tendrá en cuenta un factor de corrección en función del Valor Límite Ambiental de exposición para cada sustancia.

El INSHT ha publicado en 2014 una lista actualizada de dichos valores que se puede consultar en:

<http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Instituto/Comision/GruposTrabajo/ficheros/documentoLEP2014definitivo.pdf>

Una vez analizados cada uno de los parámetros definidos en el método se calcula el riesgo por inhación ( $P_{inh}$ ) aplicando la siguiente fórmula:

$$P_{inh} = P_{riesgo\ potencial} \times P_{volatilidad} \times P_{procedimiento} \times P_{protección\ colectiva} \times FC_{VLA}$$

El valor del riesgo por inhalación nos permite caracterizar el riesgo y priorizar acciones.

Puntuación del riesgo por inhalación	Prioridad de acción	Caracterización del riesgo
> 1000	1	Riesgo probablemente muy elevado. Medidas correctoras inmediatas
> 100 y = 1000	2	Riesgo moderado. Necesita probablemente medidas correctoras y/o una evaluación más detallada (mediciones)
= 100	3	Riesgo a priori bajo. Sin necesidad de modificaciones

Este método simplificado sirve para efectuar un primer diagnóstico de la situación a evaluar y puede servir para concluir la evaluación en casos sencillos cuando el riesgo es bajo, pero su aplicación no es suficiente cuando se trata de situaciones complejas para las que se realizará una evaluación detallada con mediciones.

En todo uso de productos químicos, se establecen siempre una serie de medidas de protección generales:

- Como norma general, en los laboratorios siempre habrá una buena ventilación.
- Las operaciones con productos químicos se realizarán preferentemente en Vitrinas de Extracción de Gases.
- La Ficha de Datos de Seguridad de todos los productos debe estar siempre disponible.
- Siempre que sea posible, utilizar dispositivos de trasvase automáticos.
- Para la manipulación de los productos químicos es obligatorio el uso de guantes de protección química adecuada al producto utilizado.
- Respetar el procedimiento de trabajo establecido.
- Informar a los trabajadores sobre los riesgos y las normas preventivas.
- Identificar correctamente la zona de almacenamiento de productos químicos.
- No comer, ni beber, ni fumar durante el trabajo.

Además, se establecerán unas medidas específicas en función de los resultados o hallazgos realizados en el proceso de evaluación, como por ejemplo, modificar el tipo de ventilación, ajustar el procedimiento de trabajo, sustituir (si se puede) el agente químico...

# SEGURIDAD EN 5 MINUTOS

En todo caso, habrá que comprobar periódicamente el buen funcionamiento de las medidas de control establecidas. Y dentro de un ciclo de mejora continua, evaluar su aplicación y efectividad y proponer mejoras sobre las mismas en base a esta comprobación.

La prevención es una labor permanente y de todos, nunca lo olvidéis.

## Documentación consultada

- *Límites de exposición profesional para agentes químicos en España 2014*. INSHT 2014.
- *Riesgo químico: Sistema para la Evaluación Higiénica. Utilización de un método simplificado*. INSHT 2011.
- *Guía técnica para la evaluación y prevención de los riesgos relacionados con los agentes químicos presentes en los lugares de trabajo*. INSHT 2013.



## El control sanitario en el pez cebra: De dónde venimos y adónde vamos

**Juan Ramos Blasco, DVM**

Supervisor de la sección de animales acuáticos.  
Parc de Recerca Biomédica (PRBB)

Para inaugurar esta sección de la revista dedicada al control sanitario se me ha preguntado por la situación del pez cebra en investigación.

He de decir que los que tratamos con peces, miramos con envidia el conocimiento y la estandarización conseguidos en la definición de los controles de las colonias de roedores según su clasificación sanitaria (ver Tabla 1), lograda después de muchos años de investigación con estos modelos animales.

1. **Convencional:** Animales sanos sin analíticas de control sanitario.
2. **SPF** (*Specific Patogen Free*): Animales libres de patógenos específicos.
3. **SOPF** (*Specific and Oportunistic Patogen Free*): Animales libres de patógenos y oportunistas específicos.
4. **Axénicos:** Animales libres de cualquier microorganismo.

**Tabla 1.-** Clasificación sanitaria en roedores.

El auge del pez cebra en el mundo de la investigación biomédica se produjo en el momento en el que se completó la secuenciación de su genoma a principios de este siglo. Una de las facetas más codiciadas es la de llegar a definir y establecer una calidad sanitaria parecida al SPF, pero son diversos los factores que todavía no han permitido alcanzarlo.

Es un modelo emergente por lo que cada vez existen más animalarios acuáticos. La gran facilidad para generar nuevas líneas genéticas y el constante intercambio de las mismas entre los grupos de investigación, ha favorecido la dispersión de ciertos patógenos. Actualmente, podríamos clasificar sanitariamente las colonias de pez cebra como convencionales, a nivel internacional. Aún queda mucho trabajo para conseguir que sean libres de

patógenos específicos. Para esto hace falta, en primer lugar, una puesta en común sobre las distintas patologías que afectan al pez cebra, así como su epidemiología y repercusiones en la investigación. Todavía no existe un liderazgo para dirigir estos esfuerzos de la comunidad acuática y erradicar ciertas patologías altamente distribuidas. Tampoco existe una imagen global del estatus sanitario de los peces cebra.

Por ejemplo, uno de los patógenos que más afecta al *Danio rerio* es la *Pseudoloma*. Este patógeno (que se instala en el sistema nervioso y que normalmente cursa de una manera crónica, provocando una serie de síntomas bastante inespecíficos como la emaciación, disminución de los índices reproductivos y deformidades del raquis – ver Figura 1) aún es un gran desconocido. No se sabe a ciencia cierta cómo se trasmite, lo que dificulta más su erradicación. Eso sí, parece que es capaz de superar las barreras que le ponemos para evitar su dispersión: el “lavado” de los huevos de los peces procedentes de otras instalaciones (proceso de desinfección de la superficie del huevo mediante el uso de lejía: *bleach* en inglés), así como el empleo de cuarentenas, se han demostrado inefectivos para erradicar la *Pseudoloma neurophila*.



**Figura 1.-** Deformidades del raquis.

## Control Sanitario

El uso de alimento vivo añade una complicación adicional, ya que podemos introducir patógenos por una nueva vía. Parece, por ejemplo, que ciertas larvas de insectos (aun congeladas) pueden contener ciertos parásitos, o que el uso de paramecio puede favorecer la dispersión, o incluso la infección, de alguna de las micobacteriosis que pueden afectar al pez cebra.

A esta situación, hemos de añadir otros factores que complican aún más el llegar al tan deseado y codiciado estatus SPF. Por ejemplo, el control medioambiental es mucho más complejo de analizar y de mantener debido a la existencia de bacterias y hongos muy ubicuos, que están presentes de manera normal en el agua y que pueden generar patologías. A la hora de fijarnos en el agua deberemos prestar atención tanto a la calidad microbiológica, como a la físico-química, ya que pueden ser causantes de multitud de patologías.

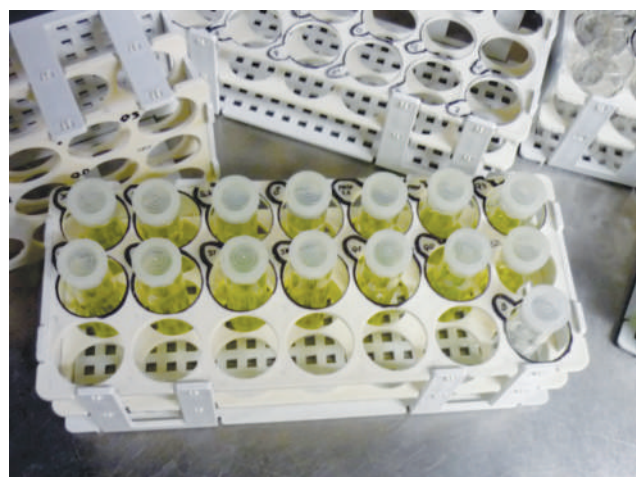
El conjunto de acuarios que comparten el agua recirculada se llama sistema. Cada sistema es una unidad microbiológica, es decir, todos los acuarios con sus animales comparten el mismo estado sanitario. Cualquier entrada de un agente infeccioso se distribuye a toda la colonia a través del agua (ya que el agua ejerce a la vez de barrera y vector). Por si fuera poco, el diseño de los sistemas no suele hacer factible la eliminación mecánica del biofilm (capa de carácter orgánico formada por la precipitación de los elementos disueltos en el agua – ver Figura 2), generada en las conducciones, permitiendo el emplazamiento de ciertos patógenos en las instalaciones. Además, resulta prácticamente imposible la desecación (que es un método de desinfección eficaz) de ciertas partes de estos sistemas.



**Figura 2.-** Formación del biofilm.

En cuanto a la calidad microbiológica del agua todavía no se ha llegado a un acuerdo: mientras que hay quien parece abogar por el control de los patógenos directamente en el agua, otros piensan que es más sensato centrarse en la carga total de bacterias aerobias presentes (lo que es indicativo de la calidad microbiológica del agua), indicador del funcionamiento de nuestras lámparas ultravioletas y de los métodos de limpieza. Eso sí, no hay una recomendación al respecto y se suelen emplear muchas veces como referencia las guías sobre fuentes de agua potables o piscinas.

El control de los parámetros físico-químicos se hace esencial si queremos mantener a los peces dentro de sus rangos biológicos (conservando así su homeostasis), y evitar distintas patologías no infecciosas (ver Figura 3). Estos problemas asociados a la calidad físico-química del agua pueden ser de diversa índole como enfisemas (microburbuja), estrés crónico (hipoxia, nitratos, tóxicos) o de carácter más agudo (amoníaco, por ejemplo). Parece que se empieza a llegar a un consenso más o menos generalizado en cuanto a los parámetros a controlar y los valores deseados. Eso sí, su mantenimiento y control requiere un esfuerzo casi diario.



**Figura 3.-** Control parámetros químicos.

Esta situación aún se agrava más si le añadimos el gran desconocimiento sobre la calidad genética de los animales y sus posibles implicaciones en la generación de diversas patologías. También parece que ciertas manipulaciones o la forma de gestionar las colonias pueden aumentar la incidencia de ciertas patologías (sobremaduración de oocitos, heridas, etc.- ver Figuras 4 y 5).

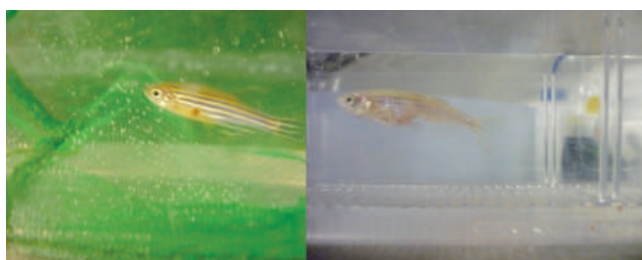


**Figura 4.- Sobremaduración de huevos.**

A pesar de estas dificultades, existen acciones que parecen que nos llevan hacia el buen camino: el de los roedores.

De momento, gracias a la erradicación del uso de animales procedentes de tiendas de acuariofilia (ahora ya por imperativo legal) se ha facilitado la desaparición de la *Pseudocapillaria* (parásito intestinal de la familia de los nematodos) y del *Piscinoodinium* (un dinoflagelado que parasita a distintos peces), lo que es ya un avance significativo.

Michael Kent ha puesto a punto los *primers* para elaborar PCRs que permiten la detección de *Pseudoloma*, convirtiéndole en un gurú de la patología en pez cebra. Esto está permitiendo que distintos laboratorios del mundo tengan validadas ya las PCR para la detección de este patógeno, como en el ZIRC (*Zebrafish International Resource Center* de Oregón) donde se están generando, poco a poco, stocks de reproductores libres de *Pseudoloma*. También existen otras PCRs que nos permiten detectar la presencia de otros patógenos como *Mycobacterium spp.*, y otras bacterias (pero hay que recordar su ubicuidad).



**Figura 5.- Ulceración en pez cebra.**

Para alcanzar el objetivo deseado, en mi opinión se debería trabajar en distintas direcciones:

1. Implementar el sistema de desinfección de los huevos y la gestión de las cuarentenas. Esto se ve facilitado por la disposición de PCR frente a distintos patógenos y la detección cuasi-inmediata de los mismos, que a su vez, permitiría la generación de stocks libres de *Pseudoloma neurophila* e idealmente, de otros patógenos.
2. Centrarse en las implicaciones genéticas de los distintos stocks y líneas, de las que empieza a haber alguna información.
3. Estandarización de las condiciones de cría y gestión de las poblaciones y sus movimientos entre centros para favorecer la homogenización entre las distintas instalaciones y evitar la entrada de patógenos por esa vía (ver Figura 6).
4. Profundizar en el conocimiento de métodos fiables de desinfección de los sistemas, que incluya un diseño de los equipos, que permitan la limpieza mecánica de las distintas conducciones. Estandarizar dichos sistemas de desinfección. Actualmente el cloro es uno de los sistemas predilectos pero su eficacia varía según diversos factores.



**Figura 6.- La gestión de las cuarentenas es indispensable.**

Actualmente existen grupos de trabajo que están empezando a elaborar guías para el pez cebra (como las asociaciones FELASA, AAALAC, ZHA, etc.), pero todavía no son muy específicas. Aunque hay literatura al respecto, muchas veces los resultados son contradictorios. Por ello se hace necesario potenciar las asociaciones de pez cebra con objeto de recopilar distintas experiencias y llegar a un consenso más o menos generalizado que nos guíe en la buena dirección.

## BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- Noga E.J. *Fish Disease: Diagnosis and Treatment*. 2a Ed. Wiley-Blackwell 2010.
- Westerfield M. *The Zebrafish Book; A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Brachydanio rerio)*. University of Oregon Press 1989.
- [http://zebrafish.org/health/pdf/zirc\\_pcr\\_prot\\_p\\_neurophilia.pdf](http://zebrafish.org/health/pdf/zirc_pcr_prot_p_neurophilia.pdf)
- Murray K.N., Dreska M., Nasiadka A., Rinne M., Matthews J.L., et al. *Transmission, diagnosis, and recommendations for control of Pseudoloma neurophilia infections in laboratory zebrafish (Danio rerio) facilities*. *Comp Med*. 2011, (4):322-9.
- Nüsslein-Volhard C. and Dahm R. *Zebrafish: a practical approach*. New York: Oxford University Press 2002.
- Takaku K., Davis J.M., Winglee K., and Ramakrishnan L. *Evaluation of the pathogenesis and treatment of Mycobacterium marinum infection in zebrafish*. *Nature Protocols* 2013, 8: 1114-24. doi:10.1038/nprot.2013.068
- Reed B. and Jennings M. *Guidance on the housing and care of Zebrafish Danio rerio*. Research Animals Department, Science Group, RSPCA 2011. <http://science.rspca.org.uk/sciencegroup/researchanimals/implementing3rs/housingandcareaquaticspecies>



## PRINCIPIOS ÉTICOS EN INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA CON MODELOS ANIMALES

6

LOS ANIMALES DEBEN ESTAR ESTABILADOS EN JAULAS Y RECINTOS QUE REÚNAN CONDICIONES AMBIENTALES APROPIADAS PARA CADA ESPECIE, EN LOS QUE, ADEMÁS, PUEDAN DESARROLLAR COMPORTAMIENTOS PROPIOS DE SU ESPECIE.



Foto: shutterstock

# Investigación transparente

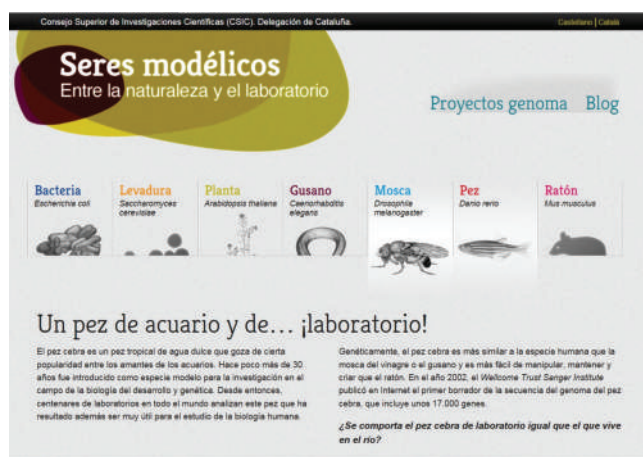
**Daniel Baizán Vicent**

*Danio rerio*, el pez cebra, se ha convertido en uno de los referentes para la investigación biomédica y recientemente se le considera uno de los mejores organismos para investigar infecciones tan importantes como el ébola.

En este artículo vamos a nadar por varias páginas web para ver qué nos puede ofrecer el pez cebra. Las ventajas de este pequeño ser van desde su adaptación al medio hasta sus posibilidades biomédicas; y eso le ha colocado en una posición privilegiada entre los animales de laboratorio.

La primera parada que realizaremos para conocer al pez cebra será en el Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). A pesar de sus 75 años de edad, el CSIC sigue a la cabeza de la investigación española y también tiene al pez cebra entre sus modelos de investigación.

En la página [www.seresmodelicos.csic.es](http://www.seresmodelicos.csic.es) vamos a encontrar al pez cebra entre otros.



Para aquellos que desconozcan el origen del *Danio rerio* esta web les va a mostrar unas pinceladas de todo lo que aporta a la investigación.

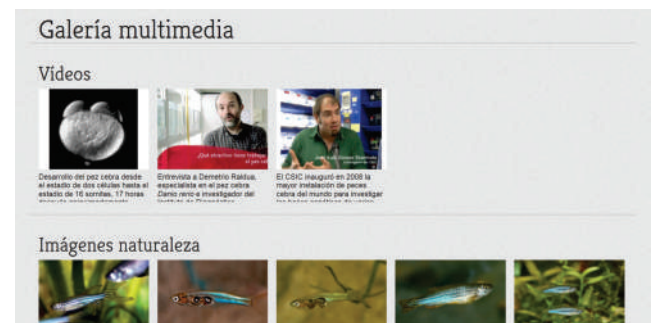
[www.seresmodelicos.csic.es](http://www.seresmodelicos.csic.es)  
[www.fishforpharma.com](http://www.fishforpharma.com)  
[desarrollo-pez-cebra.blogspot.com.es](http://desarrollo-pez-cebra.blogspot.com.es)

[www.seresmodelicos.csic.es](http://www.seresmodelicos.csic.es)

[www.fishforpharma.com](http://www.fishforpharma.com)

[http://desarrollo-pez-cebra.blogspot.com/es/](http://desarrollo-pez-cebra.blogspot.com.es/)

Uno de los apartados que destacaremos en esta página es la galería multimedia en la que vamos a encontrar muchas fotografías del pez cebra, pero también unos videos muy interesantes contados por investigadores que tienen mucho que decir sobre estos organismos.



Una vez nos hayamos empapado bien de toda la información es hora de nadar hasta el siguiente punto de conocimiento del pez cebra.

En este caso nos trasladaremos a la Red de Formación Inicial Marie Curie en la que un ambicioso programa con fondos europeos pretende sacarle el máximo rendimiento a las investigaciones con el pez cebra.



# Libros y páginas web

Con inicio en enero de 2012 y una duración de 4 años, [www.fishforpharma.com](http://www.fishforpharma.com) tiene como objetivos prioritarios:

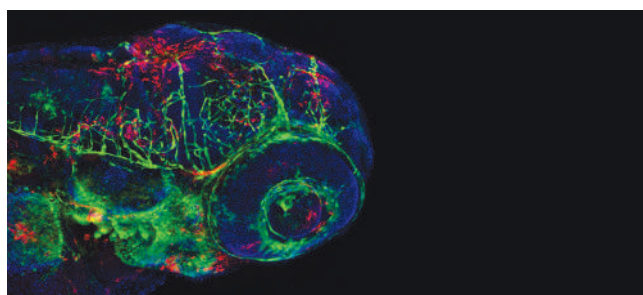
- Aprovechar el pez cebra como modelo de alto rendimiento para los programas de investigación de enfermedades infecciosas humanas y el desarrollo de medicamentos.
- Formar una nueva generación de jóvenes investigadores con conocimientos multidisciplinarios para introducir modelos de pez cebra en las ciencias biomédicas y en el cribado pre-clínico de fármacos.

Con estos objetivos bien claros, nos vamos a encontrar a un conjunto de países que aúnan esfuerzos en un proyecto que, poco a poco, va obteniendo resultados satisfactorios.

Además, la página también aporta información sobre el porqué del uso de los *Danio rerio* en investigaciones tan específicas como las que se realizan.



Entre las adheridas a este proyecto se encuentran dos entidades españolas que aportan todo su potencial para sacar el máximo partido a estos pequeños organismos. Fruto de ello son los resultados que se pueden encontrar en la web, que muestran los beneficios de trabajar con estos peces para determinadas investigaciones. Y como aporte extra, la galería de imágenes es muy curiosa.



Finalmente, nuestra última parada acuática es Uruguay. En este caso vamos a sumergirnos en un blog que se creó en 2011 y que perdura hasta la actualidad. A caballo entre el aporte científico y el educativo encontramos <http://desarrollo-pez-cebra.blogspot.com.es/>, un blog que nos va a aportar otra serie de informaciones sobre el pez cebra. Siendo quizás la página menos formal, no deja de dotarnos de valiosa información a diversos niveles.



Entre la información que nos vamos a encontrar en esta página destaca el acceso a un blog homónimo que nos ampliará el abanico de datos del pez cebra y también, una serie de *power points* realizados por docentes de universidades uruguayas que nos permitirán ver, con más claridad, algunos de los motivos del uso de estos organismos.

Hasta aquí hemos llegado nadando con el *Danio rerio*, que nos ha mostrado todo lo que nos puede aportar para mejorar la vida. Pero, al igual que el resto de peces, no debemos detenernos aquí sino continuar surcando el océano del conocimiento para poder llegar un día a un buen puerto.

Cuando la trazabilidad es una necesidad **SOURALIT** es su garantía

# SOURALIT

Madera no resinosa

Mínima presencia de polvo

Gran capacidad de absorción

Presentaciones irradiadas envasadas al vacío

Análisis microbiológicos y físico-químicos de los lotes entregados



## Conjuntivitis crónica en ratones: papel de los agentes oportunistas

Ángel Naranjo Pino

Centro Nacional de Biotecnología-CSIC

Una colonia de ratones de la cepa B6;129P2-Cd19<sup>tm1(cre)Cgn</sup>/J alojados en una zona de barrera comenzaron a desarrollar, alrededor de los ojos, los siguientes signos clínicos (ver Figura 1):

- Alopecia.
- Inflamación palpebral.
- Exudado periocular.
- Ulceraciones.

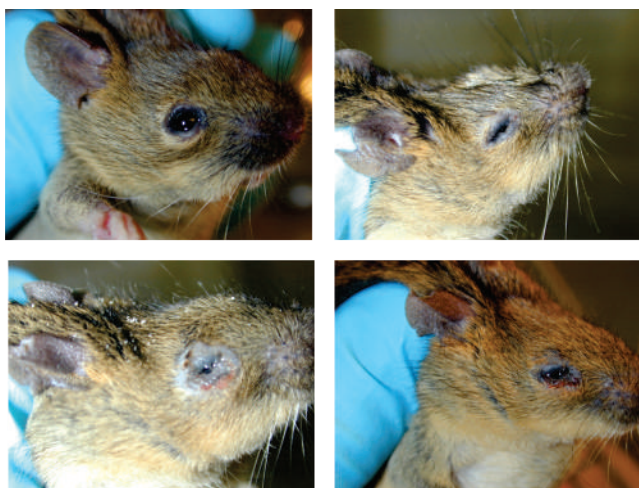


Figura 1.- Signos clínicos presentes en los ratones afectados.

Todos los animales con signos clínicos eran mayores de 3 meses. Los signos clínicos se daban tanto en machos como en hembras.

En todas las cubetas de esta cepa algún animal presentaba algún signo clínico de los anteriormente citados.

El control sanitario de los animales de la zona se había realizado recientemente utilizando centinelas y siguiendo las recomendaciones de FELASA. Todos los resultados de los

centinelas testados eran negativos. No existían resultados históricos positivos relacionados con los signos clínicos. Se realizaron necropsias de varios animales y se tomaron muestras para bacteriología.

Los informes patológicos observaron las siguientes lesiones (ver Figura 2):

- Conjuntivitis crónica activa caracterizada por infiltración inflamatoria de células mono y polinucleares, y macrófagos.
- Hiperplasia de epitelios conjuntival y corneal.

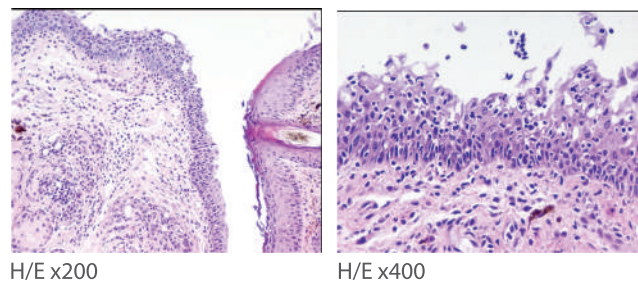


Figura 2.- Conjuntivitis crónica activa con infiltración de mono y polinucleares y macrófagos. Hiperplasia de epitelios conjuntival y corneal. Hiperplasia y ligera infiltración inflamatoria del epitelio palpebral

Los informes microbiológicos detectaron Cocos Gram-positivos, coagulasa negativos (ver Figura 3).

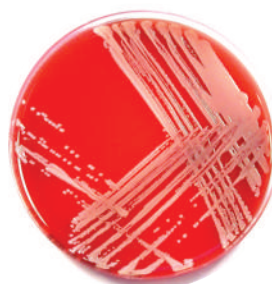


Figura 3.- Aspecto macroscópico de las colonias de *Staphylococcus xylosum* en placas de Agar-sangre.

¿Y tú qué opinas?

¿De qué agente infeccioso puede tratarse?

¿Qué otras pruebas de diagnóstico harías?

¿Cómo lo tratarías?

¿Qué medidas tomarías?

¿Qué importancia tiene?

## SOLUCIÓN

Se aisló e identificó *Staphylococcus xylosus*, mediante cultivo y perfil bioquímico en dos laboratorios distintos, confirmándose su identificación mediante PCR y secuenciación del 16sr DNA (1).

Se realizó un antibiograma para establecer el tratamiento más adecuado. La bacteria era sensible a la mayoría de los antibacterianos utilizados normalmente (ver Tabla 1).

En un primer momento se aisló la colonia evitando el contacto con otros animales. Las cubetas de estos animales eran las últimas que se cambiaban, y todo el material sucio se metía en bolsas para su procesado de forma independiente del resto del material. El personal que manipulaba estos animales no manipulaba otros animales en el resto del día.

Aislado	<i>S. xylosus</i>
Trimetro/sulfamet.	Sensible
Gentamicina	Sensible
Neomicina	Sensible
Ampicilina	Intermedio
Amoxiciclina	Intermedio
Cefalexina	Sensible
Eritromicina	Sensible
Clindamicina	Sensible
Enrofloxacina	Intermedio
Marbofloxacina	Sensible
Sulfonamidas	Sensible
Tetraciclina	Sensible

Tabla 1.- Antibiograma.

*Staphylococcus xylosus* es una bacteria coco Gram-positivo, coagulasa negativo, del género *Staphylococcus* que se aísla fundamentalmente de biofilms, y de un amplio número de alimentos (quesos, leches, embutidos, etc.) procedentes de animales, para el consumo humano. También se ha descrito la presencia de esta bacteria en contaminaciones intrahospitalarias en humanos inmunocomprometidos, en pielonefritis, endocarditis, etc.

Asimismo, se ha aislado *S. xylosus* en dermatitis de ratones nude (2), en lesiones necróticas de la cola de ratones SJL/J (3), en dermatitis granulomatosa alrededor de los pabellones auriculares de ratones C57BL/6J-Nos2<sup>tm1Lau</sup> (4) y en múltiples localizaciones en diferentes líneas de ratones con alteraciones de la funcionalidad de los macrófagos (5). Entre estas localizaciones estaban los párpados y la conjuntiva ocular.

Inicialmente se estableció en la colonia un tratamiento de Sulfametoxazol-trimetropin a dosis de 15 mg/kg en el agua de bebida durante 28 días, como se había descrito en la literatura.

Este tratamiento no eliminó los signos macroscópicos ni la aparición en la colonia de nuevos ratones con signos clínicos.

Por dicho motivo se estableció un nuevo tratamiento con un colirio de gentamicina al 0.3% por vía tópica durante 5 días, aplicado dos veces día. Este tratamiento eliminó los signos clínicos en aquellos animales que estaban en fases iniciales y que aún no presentaban úlceras.

*S. xylosus* es un organismo comensal de la piel de los ratones (6). En algunas ocasiones, dependiendo del hospedador y de las circunstancias, especialmente en animales inmunodeficientes, produce alteraciones y signos clínicos que pueden ir desde problemas en la piel (dermatitis, úlceras, blefaritis, conjuntivitis, etc.) hasta abscesos en órganos internos (nódulos linfáticos, pulmón, músculos, etc.)

Se refuerza la idea de *S. xylosus* como un agente oportunista en infecciones muy localizadas, en nuestro caso dérmica y mucosa externa, como es la conjuntiva ocular y el área palpebral.

## ¿Y tú qué opinas?

No es uno de los agentes que FELASA (7) recomienda controlar; y por este motivo, es posible que su presencia esté siendo minusvalorada en ese tipo de lesiones.

Como ocurre con otros fármacos, por problemas de distribución corporal y biodisponibilidad, la antibioterapia parenteral en las conjuntivitis tiene una peor eficacia, dando mejores resultados los tratamientos con antibióticos por vía tópica. El problema radica en lo laborioso del proceso de la aplicación del colirio a todos los animales en el caso de poblaciones grandes.

Habrà que plantearse la posibilidad de seguir con el tratamiento hasta su erradicación, la salida de los animales de la zona de barrera y posterior rederivación, e incluso el cruce con animales del fondo genético (C57BL/6J) para eliminar posibles susceptibilidades por motivo de alteraciones genéticas desconocidas que hayan aparecido en una cepa aún no congénica.

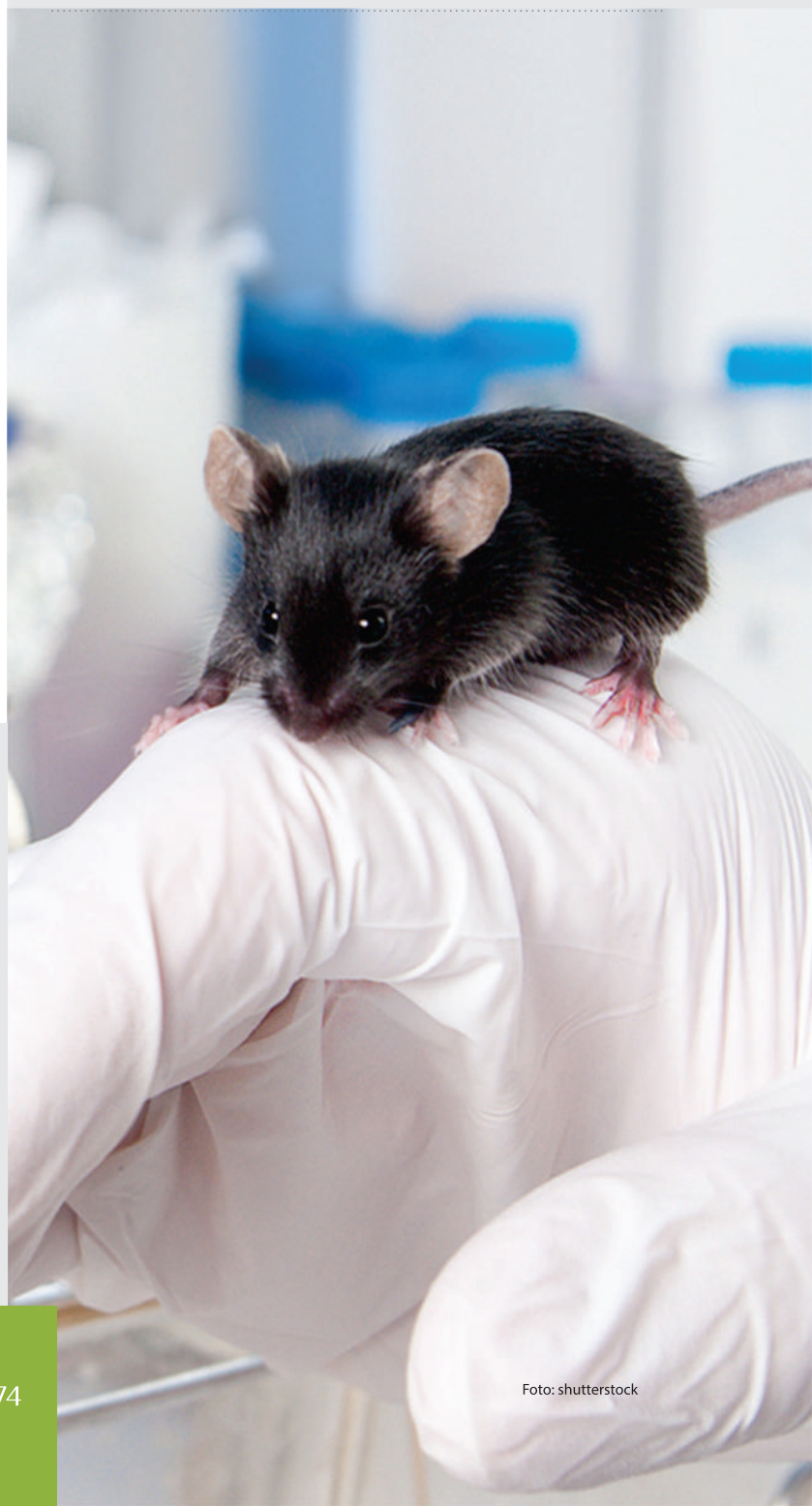
### Agradecimientos:

Queremos agradecer de manera especial a Alistair Thompson y H. Donnelly (Surrey Diagnostics), y a Alba de Martino (CNIO) por su ayuda con la aportación del diagnóstico microbiológico y patológico respectivamente.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Corbiere Morot-Bizot S., et al. *Development of a multiplex PCR for the identification of Staphylococcus genus and four staphylococcal species isolated from food.* Journal of Applied Microbiology 2004, 97: 1087-94.
2. Bradfield J.F. *Epizootic fatal dermatitis in athimic nude mice due to Staphylococcus xylosus.* Lab Ani Science 1993, 43: 111-3.
3. Thornton V. *Inoculation of Staphylococcus xylosus in SJL/J Mice to Determine Pathogenicity.* Contemporary Topics 2003, 49-52.
4. Y. Won. *Identification of Staphylococcus xylosus isolated from C57BL6/J-Nos2tm1Lau mice with dermatitis.* Microbial Immunology 2002, 629-32.
5. Gozalo A.S., Hoffmann V.J., Brinster L.R., et al. *Spontaneous Staphylococcus xylosus Infection in Mice Deficient in NADPH Oxidase and Comparison with Other Laboratory Mouse Strains.* JAALAS 2010, 49(4): 480-6.

6. Nagase N. *Isolation and species distribution of staphylococci from animal and human skin.* Journal of Veterinary Medical Science 2002, 64(3):245-50.
7. FELASA working group. *FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units.* Laboratory Animals 2014, 48(3): 178-92.



## Joana Visa Esteve

*Responsable de Bienestar Animal  
Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL)*

¿Desde cuándo es socia de SECAL y qué opinión le deja nuestro colectivo?

No me acuerdo desde cuando soy socia de SECAL, pero en el 2001 estuve en la Junta. SECAL fue el paraguas que me acogió cuando decidí cambiar mi rumbo en mi carrera profesional de postdoctoral como patóloga hacia el mundo del animal de laboratorio. La SECAL tiene el valor que tiene por el perfil altruista de sus socios. Y en mi caso de los socios "fundadores" que fueron los que me "mentorizaron".

Según su experiencia, ¿cómo describiría el pasado, presente y futuro en relación a la formación del personal que trabaja con animales de laboratorio?

*La formación requiere tiempo, dinero y voluntad. Con recomendaciones (como la de FELASA), la publicación de la nueva directiva y sobre todo con la nueva orden ministerial, disponer de un plan de formación ya no será voluntario sino reglamentario.*

Si hay que solicitar presupuesto en un momento con pocos recursos, si hay que reorganizar tareas porque un técnico se ausenta para ir a un curso en un momento con reducción de personal, el cumplimiento legal facilita las gestiones con dirección. Vamos a mejorar.

¿Cuál cree que puede ser el mejor camino para regular y acreditar la formación en el ámbito del animal de laboratorio?

El camino ideal sería que la hoja de ruta viniese de Europa. Permitiría armonizar y facilitar el movimiento del personal.

La formación continua sirve entre otras cosas como estrategia para alcanzar los objetivos legales, pero ¿es una herramienta para motivar al trabajador?

Para la mayoría de técnicos el poder realizar nuevas tareas es un factor de motivación efectivo. Para asegurar que las tareas se



cumplan adecuadamente es necesario que se apoyen en una buena formación (formación en el lugar de trabajo). Si el proceso formativo es externo al centro, la relación que se establece (*networking*) con otros técnicos favorece el mantener al técnico motivado.

Para aquellos técnicos con dificultades para participar en cursos, la formación *on line* puede ser una opción que permita crecer a nivel formativo y sentirse más valorado.

El animalario del IDIBELL tiene una acreditación de calidad. ¿Qué consejo le daría a un responsable de un animalario, antes de pensar en una acreditación?

Cuanto más haya que mejorar, más beneficios se obtienen de participar en un sistema de evaluación externo.

El segundo punto que me gustaría destacar es que los diferentes sistemas de calidad son complementarios. Por ejemplo, el sistema de gestión de la carpeta curricular al que te

obligan las BPLs, es perfectamente útil para cumplir los requisitos del AAALAC y de la ISO 9000. Sin embargo, antes de decidir qué tipo de sistema es el más idóneo recomendaría disponer de un plan estratégico que defina claramente la visión, misión y objetivos del animalario y cómo encajan con los del instituto o centro al que pertenece.

**¿Cuál cree que es la perspectiva de la investigación biomédica en los modelos animales en Europa, a propósito de la nueva directiva?**

La realización de algunos procedimientos "severos" o con especies sensibles se va a llevar a cabo fuera de Europa, o en aquellos países que forman parte de la UE y no hayan traspuesto la directiva.

**Por último. 5 frases claves en la gestión de un animalario.**

Disponer de un plan estratégico que incluya:

- Plan de formación (incluidos investigadores y técnicos).
- Gestión del Personal.
- Gestión económica para ser sostenible.
- Implementar y actualizar el plan estratégico.



### PRINCIPIOS ÉTICOS EN INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA CON MODELOS ANIMALES

7

LOS ENSAYOS DEBEN REALIZARSE CON UN GRADO DE REFINAMIENTO QUE EVITE DOLOR, SUFRIMIENTO O ANGUSTIA INNÉSARIOS DE LOS ANIMALES. SE DEBEN ESTABLECER CRITERIOS DE PUNTO FINAL, Y PAUTAS DE ANESTESIA Y ANALGESIA ADECUADAS EN FUNCIÓN DE LA SEVERIDAD DE CADA PROCEDIMIENTO.





Powering your research development



## Profesionales al servicio de la investigación

### Servicios integrales para Animalarios

Externalización de servicios de Animalarios

Formación de personal

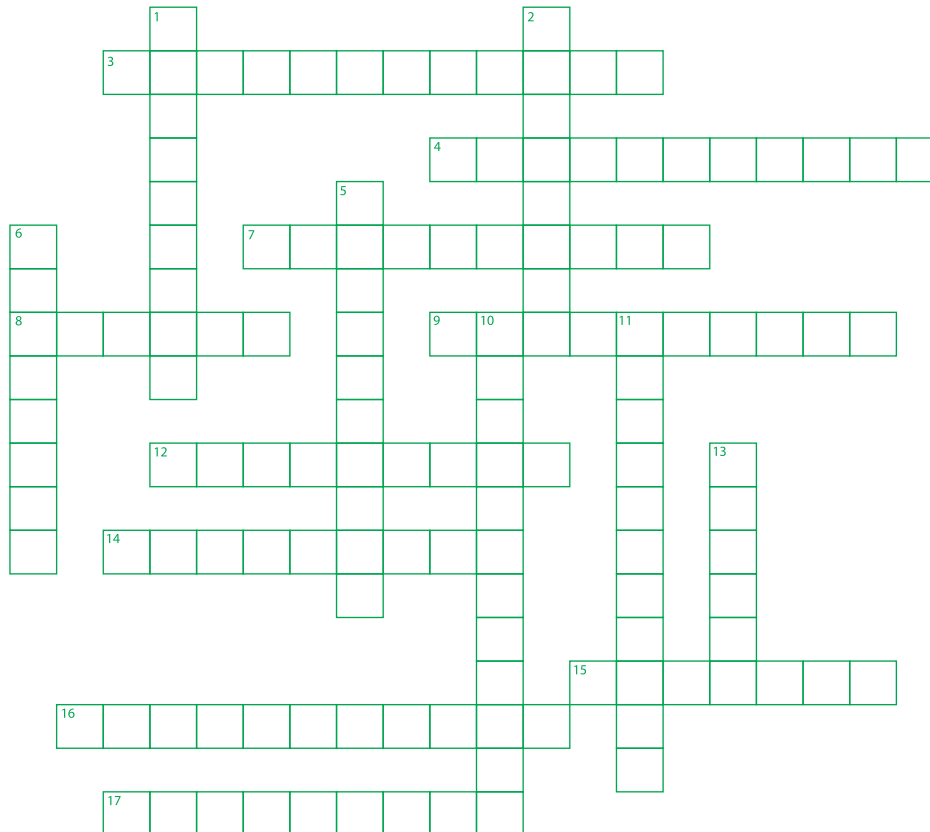
Diseño de Instalaciones

Alquiler y gestión de Instalaciones

Consultoría y Asesoramiento



[www.vivotecnia-ms.com](http://www.vivotecnia-ms.com)



## Horizontal

3. Prueba conductual utilizada para evaluar la ansiedad en roedores y basada en el conflicto de tendencias innatas de evitar espacios abiertos.
4. Antiparasitario muy útil en el tratamiento de varias infestaciones por ectoparásitos.
7. Existencia de dos formas o dos aspectos anatómicos diferentes en una misma especie.
8. Grupo experimental en todo procedimiento al que no se le administra nada, ni tan solo vehículo; es un control de valores basales.
9. Orden de mamíferos que se caracteriza por poseer dos pares de incisivos superiores de crecimiento continuo y carecer de caninos.
12. Ciencia que tiene como objetivo clasificar los seres vivos atendiendo a sus características, desde las más generales a las más específicas.
14. Realización científica universalmente reconocida que, durante cierto tiempo, proporciona modelos de problemas y soluciones a una comunidad científica.
15. Descendiente de un cruce entre dos líneas consanguíneas diferentes.
16. Procedimiento quirúrgico que implica una gran incisión para acceder a la cavidad abdominal.
17. Suministro de sustancias de manera lenta pero sostenida a un sistema, un aparato, un tejido o un órgano, por vía intravenosa.

## Vertical

1. En ratones, pérdida de pelo alrededor de la cabeza, vibrisas, hocico, y hombros principalmente. Se considera un indicador de dominación social (voz inglesa).
2. Conducta de inmovilidad o petrificación, inducida por miedo ante estrés condicionado (voz inglesa).
5. Medición para caracterizar la fase del ciclo estral y determinar el momento de máxima receptividad de la hembra a la monta.
6. Pelos especializados que poseen algunos animales como elemento sensorial táctil.
10. Período de tiempo mínimo que se debe mantener a los animales, garantizando una buena adaptación a las nuevas condiciones ambientales, antes de cualquier procedimiento experimental.
11. Crecimiento excesivo de los incisivos, que origina dificultades para el cierre de la boca.
13. Cepa de rata utilizada como modelo genético para la investigación sobre la obesidad y la hipertensión.



# The Weight is Over.

No longer do you need to spend your time conditioning research models. There is now an immediate solution - Preconditioning Services from Charles River. Whether preparation for your study requires feeding special diets, aging of animals, phenotypic evaluations, or surgical manipulations, Charles River can provide you with animals preconditioned to your parameters and ready for use when they enter your facility.

For more information, please contact us at [services@eu.crl.com](mailto:services@eu.crl.com)



# Referencias disponibles bajo demanda.

Rendimiento probado  
de líneas celulares.

Tal como demuestran publicaciones de las más reconocidas instituciones investigadoras de todo el mundo, los modelos oncológicos de Harlan Laboratories ofrecen especificaciones de alta calidad, dietas y servicios de asistencia que pueden necesitar en su investigación contra el cáncer.

Para más información, visite nuestra Web [www.harlan.com/oncology](http://www.harlan.com/oncology).

Modelos

Dietas

Servicios



[www.harlan.com](http://www.harlan.com)

©2010 Harlan Laboratories, Inc.  
Harlan, Harlan Laboratories, Helping you do research better, and the Harlan logo are trademarks of Harlan Laboratories, Inc.