



Mantenimiento y cría de peces cebra (*Danio rerio*) en el laboratorio: Reproducción natural y artificial



Trabajo Fin de Máster
Sara Palomino Echeverría

MÁSTER UNIVERSITARIO EN INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA SALUD
Facultad de Ciencias de la Salud

Curso 2017-2018

Tutor de la universidad: Miguel Ángel Barajas Vélez. Doctor en biología y profesor titular de la Universidad Pública de Navarra (UPNA)

Tutor externo: Iranzu Lamberto. Doctora en Biología celular y molecular, y directora de operaciones y cofundadora de Ikan Biotech (Noáin, Navarra)

Autorización de la defensa

Miguel Ángel Barajas Vélez en calidad de tutor del trabajo de fin de máster certifica que el presente trabajo realizado por Sara Palomino Echeverría, graduada en Bioquímica y estudiante del Máster en Investigación en Ciencias de la Salud de la Universidad Pública de Navarra, y titulado “**Mantenimiento y cría del pez cebra (*Danio rerio*) en el laboratorio: Reproducción natural y artificial**” ha sido elaborado bajo supervisión y cumple con los requisitos para optar al título de postgrado.

Y para que así conste, expedido y firmo el presente certificado.

En Pamplona, a 23 de Mayo de 2018

Resumen

En los últimos años el pez cebra (*Danio rerio*) se ha establecido como una especie en auge en la investigación científica. Su similitud genética y molecular con la de los humanos, lo convierten en un modelo versátil en el ámbito biomédico, la toxicogenómica y la ecotoxicidad.

Procedimientos de ingeniería genética han conseguido silenciar los genes encargados de la pigmentación de la piel del pez cebra originando un fenotipo transparente. Gracias a ello, es posible realizar ensayos que permiten detectar cambios a nivel morfológico y fenotípico sin sacrificio, debido a la posibilidad de hacer un seguimiento visual.

Sin embargo, el coste de peces de fenotipo transparente es muy elevado. Una solución a este problema sería la optimización de la reproducción artificial y cría asistida del pez cebra, para así obtener tantos embriones del fenotipo deseado como se necesite.

Para ello, es necesario analizar la vía hormonal reproductiva del pez con el fin de encontrar fármacos que la potencien, y desarrollar un protocolo de cría inducida hormonalmente para su implantación en el laboratorio.

Palabras clave

Pez cebra, *Danio rerio*, fenotipo *absolute*, inducción hormonal reproductiva, *Ovopel*.

Abstract

In recent years, zebrafish (*Danio rerio*) has emerged as a major model organism in investigation research. Zebrafish and human share high molecular and genetic homologies, which makes zebrafish well suited for biomedical, toxicogenomic and ecotoxicity studies.

Genetic engineering procedures have successfully created a transparent zebrafish phenotype by silencing skin pigmentation genes. This line demonstrates a complete lack of all melanocytes and iridophores in both embryogenesis and adulthood allowing *in vivo* studies without animal sacrifice.

Nevertheless, the price of transparent zebrafishes is very high. A possible solution could consist on producing transparent-derived zebrafish lines based on a specific breeding protocol.

For this purpose, it is necessary to analyze zebrafish reproductive behavior and find drugs in order to promote reproduction hormonal cycle and develop a successful method to induce artificial spawning in the laboratory.

Key words

Zebrafish, *Danio rerio*, *absolute* phenotype, hormonal induction, *Ovopel*.

ÍNDICE

Glosario de abreviaturas	7
1.Introducción.....	8
1.1 Ikan Biotech: La empresa	8
1.2 Investigación y pez cebra	9
1.2.1 Experimentación con animales de laboratorio	9
1.2.2 Pez cebra como modelo animal	11
1.2.3 Pez cebra y medicina personalizada.....	14
1.2.4 Pez cebra <i>absolute</i>	15
1.3 Biología del pez cebra	17
1.3.1 Reproducción	17
1.3.2 Embriones vs adultos	18
1.3.3 Inducción hormonal reproductiva del pez cebra	19
2.Hipótesis y Objetivos.....	21
3. Materiales y Métodos	22
3.1 Animales.....	22
3.2 Mantenimiento y calidad del agua	22
3.3 Alimentación	24
3.4 Cría natural	25
3.5 Crecimiento de las larvas.....	26
3.6 Estudio bibliográfico de fármacos candidatos para la cría artificial	27
3.7 Cría artificial: Diagrama teórico.....	28
3.8 Cría artificial: experimentación.....	30
3.8.1 Preparatorio pre-inyección.....	30
3.8.2 Anestesia, Inyección y Recuperación	30
3.8.3 Extracción del esperma y de los huevos	31
3.9 Eutanasia.....	32
3.10 Análisis estadístico	32

4. Resultados	33
4.1 Mantenimiento y calidad del animalario	33
4.2 Cría natural: Análisis de la viabilidad y supervivencia de las puestas	35
4.3 Cría Artificial.....	36
5. Discusión	39
5.1 Mantenimiento y calidad del animalario	39
5.2 Cría natural	39
5.3 Posible implantación de la cría artificial en el laboratorio	40
5.3 Cría artificial y peces cebra fenotipo <i>absolute</i>	41
6. Conclusiones	43
7. Limitaciones	44
8. Bibliografía	45
9. Anexo	48
10. Borrador de Artículo	58

Glosario de abreviaturas

CEIN	Centro Europeo de Empresas e Innovación de Navarra
DPF	<i>Days post-fecundation</i> (días post-fecundación)
EZRC	<i>European Zebrafish Resource Centre</i> (Centro de Recursos Europeo del Pez Cebra)
GWAS	<i>Genome-wide association study</i> (Estudio de asociación de genomas)
HPF	Horas post-fecundación
IACUC	Institutional Animal Care And Use Committee (Comité Institucional de cuidado y uso animal)
iPS	<i>Induced pluripotent stem cell</i> (Células madre pluripotentes inducidas)
MST	Metanosulfato de triclaína
NC3Rs	<i>National Centre for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research</i> (Organización nacional de las 3Rs en Reino Unido)
NV	No viable
WGS	<i>Whole genome sequencing</i> (Secuenciación del genoma completo)
WES	<i>Whole exome sequencing</i> (Secuenciación del exoma completo)
WPF	<i>Weeks post-fecundation</i> (semanas post-fecundación)
ZFIN	<i>Zebra Fish International Research Center</i> (Centro de Investigación Internacional del Pez Cebra)
ZIRC	<i>Zebrafish International Resource Centre</i> (Centro de Recursos Internacional del Pez Cebra)
3Rs	Principio de Reemplazamiento, Reducción y Refinamiento

1. Introducción

1.1 Ikan Biotech: La empresa

Ikan Biotech S.L. es una empresa situada en el polígono Mocholi (Noáin, Navarra) que comparte su ubicación junto a otras jóvenes compañías asociadas al CEIN, centro cuyo objetivo consiste en potenciar el desarrollo económico en Navarra mediante el estímulo del espíritu emprendedor y el apoyo a la creación de nuevas empresas.

Ikan Biotech se define como una compañía de base biotecnológica cuya herramienta clave es el pez cebra, una especie en auge en la investigación biomédica y toxicológica. Dentro de las funciones y servicios más destacados ofrecidos por Ikan Biotech se encuentran:

- *ZebraOncoFish*. Una plataforma *in vivo* a tiempo real basada en un tratamiento personalizado frente al cáncer empleando peces cebra “avatares”.
- *ZebraBactoFish*. Persigue la identificación más rápida posible del mejor agente antimicrobiano contra bacterias multirresistentes.
- *YourZebraModel*. Ofrece la posibilidad de desarrollar un modelo en peces cebra de manera personalizada, ya sea con fines de biomédicos, toxicológicos, farmacológicos o medioambientales.

La empresa dispone de varios departamentos: un laboratorio nivel S2 equipado con los medios materiales adecuados para los diversos servicios ofertados; un laboratorio de cultivo celular; el animalario con una capacidad para 4.500 peces y la oficina.



Figura 1. Acuario con peces cebra *Wild-Type* en Ikan Biotech.

Durante el periodo de prácticas en Ikan Biotech para la realización del trabajo de fin de máster, las actividades desempeñadas por la estudiante fueron las siguientes:

- Manejo del pez cebra: cría, sexado, alimentación de larvas, juveniles y adultos.
- Supervisión de los acuarios: limpieza de los mismos, revisión de bombas de agua, tanques, aireadores y control de la calidad del agua.
- Producción de embriones de pez cebra de forma natural y mediante inducción hormonal (tanto de fenotipo *wild type* como *absolute*), llevando a cabo el protocolo de reproducción artificial desarrollado durante la realización del proyecto de máster.
- Mantenimiento de los peces en los distintos estadios, seguimiento del crecimiento y análisis de la viabilidad.

1.2 Investigación y pez cebra

1.2.1 Experimentación con animales de laboratorio

Un animal de laboratorio se define como aquel perteneciente a una especie o línea con una genética definida, útil como modelo experimental para la investigación científica. El uso de animales ha supuesto un gran avance en la historia de la biomedicina, sin embargo, genera debate tanto en el ámbito científico, ético como social (1).

El continuo avance y la aparición de nuevos tipos de técnicas de experimentación, pone de manifiesto la tendencia de la sociedad hacia una ciencia más ética y eficiente, que intenta limitar el uso de animales en el laboratorio. De hecho, la investigación depende en mayor medida del uso de modelos animales que permita entender la patogénesis de las enfermedades humanas, así como testar y desarrollar nuevas terapias.

En 1959, los doctores Russell y Burch, publicaron “*The Principles of Humane Experimental Technique*”. Este tratado propuso por primera vez el enunciado de las 3Rs, sustentado en los principios de Reemplazamiento, Reducción y Refinamiento, en relación a los estudios con animales. Desde entonces se han ido implantando progresivamente legislaciones y regulaciones a nivel tanto internacional como nacional, así como políticas y organizaciones para proteger a los animales en términos de investigación científica.

El **Reemplazamiento** intenta suprimir el sufrimiento de los animales, mediante la sustitución de estos de forma total (modelos matemáticos, modelos computacionales, líneas celulares, tejidos...) o en su defecto de forma parcial, mediante el uso de organismos vivos con un sistema sensitivo menos desarrollado (invertebrados, nematodos, amebas...).

La **Reducción** minimiza el número de animales con fines experimentales, siempre y cuando permita alcanzar unos resultados con significación estadística. Es esencial que el diseño experimental esté bien definido para asegurar resultados robustos y reproducibles.

El **Refinamiento** se presenta como un método para disminuir la incidencia y severidad inhumana en los animales que aún sean necesarios para fines científicos (2).

	Definición Tradicional	Definición Contemporánea
Reemplazamiento	Métodos que eviten o sustituyan el uso de animales.	Aceleración del desarrollo y uso de modelos y herramientas, basadas en tecnología, que resuelvan los problemas científicos sin el uso de animales, o en su defecto especies con un sistema sensitivo menos desarrollado.
Reducción	Métodos que reduzcan el número de animales usados por experimento.	Diseño robusto y reproducible de los experimentos necesarios con animales, generando conocimiento útil y libre.
Refinamiento	Métodos que eviten el sufrimiento animal y promuevan su bienestar.	Investigación para mejorar el bienestar y cuidado de los animales con fines científicos.

Tabla 1. Definición de las 3Rs según “The NC3Rs”. Organización nacional de las 3Rs en Reino Unido. (<https://www.nc3rs.org.uk/the-3rs>)

Cada país posee una legislación específica en cuanto al cuidado y uso de animales de experimentación, y debe asegurarse del cumplimiento de los Principios de las 3Rs así como de las 5 libertades del bienestar animal propuestas por la Organización Mundial de Salud Animal (Libertad de hambre, sed y desnutrición; libertad de miedos y angustias; libertad de incomodidades físicas o térmicas; libertad de dolor, lesiones o enfermedades; y libertad para expresar las pautas propias de comportamiento) (3).

Adicionalmente, para poder garantizar la adecuada reglamentación no solo se deben tener en cuenta las normas de legislación nacional, sino las recomendaciones de organismos y asociaciones internacionales dedicadas a la ciencia de animales de

laboratorio (4,5). Además, se deben de tener informes clínicos estandarizados que recojan datos acerca de los animales de experimentación para poder asegurar su bienestar, correcto uso e intentar reducir al máximo el tamaño muestral. En este contexto los animales deben de ser manipulados por personal competente y específicamente cualificado, y se deben de realizar registros periódicos que recojan los signos clínicos para poder usar esa información en futuros estudios (6). En España existen diversos organismos en relación a la protección de animales de laboratorio (<https://secal.es/>; <http://www.janegoodall.es/es/> ; <http://www.addaong.org/es/>).

En los últimos años, la creciente popularidad del pez cebra en el ámbito científico debido a sus características fenotípicas, genotípicas y su aprobación por los comités éticos, está despertando el interés del mismo como alternativa al uso de otros animales “superiores”. De hecho, diferentes directivas, incluyéndose la de la Unión Europea, considera que el uso de pez cebra en sustitución de otras especies animales contribuye al Principio de las 3Rs. Por tanto, se trata de un modelo experimental útil para la investigación que respeta el movimiento hacia una ciencia más ética y eficiente.

1.2.2 Pez cebra como modelo animal

El pez de agua dulce conocido como pez cebra (*Danio rerio*), procedente del sudeste asiático, pertenece a una familia de peces teleósteos fisóstomos: los ciprínidos o carpas (*Cyprinidae*).

Su origen se encuentra en las llanuras de inundación del subcontinente indio, donde habita en aguas poco profundas y de flujo lento, cuya temperatura oscila entre los 18 y los 24°C y su rango de pH es de 6,0-8,0 (7).

En 1970 el pez cebra fue reconocido como una herramienta para la biología del desarrollo debido a la transparencia de los embriones y la rapidez en el proceso de organogénesis. En 1990, fue el organismo seleccionado para crear el primer panel de mutagénesis a gran escala de un animal vertebrado, reportando miles de mutaciones, algunas de ellas asociadas con enfermedades humanas (8). La versatilidad de las características de este organismo modelo, no solo le brindan importancia en el ámbito biomédico, sino que también ha demostrado ser útil en campos como la toxicogenómica y ecotoxicidad para analizar los efectos de la contaminación en el medio ambiente (9).

En los últimos años el pez cebra se ha establecido como un animal de uso común para el progreso científico y su introducción en los laboratorios ha sido muy notoria (Fig.2).

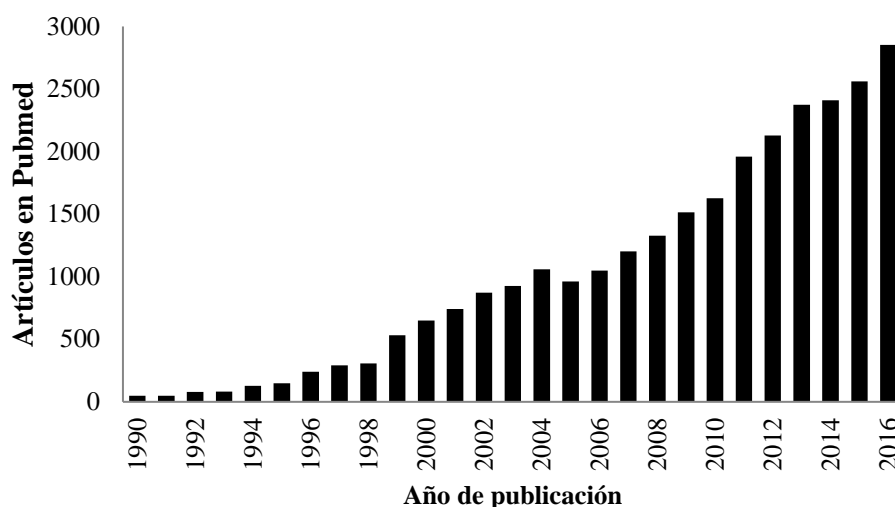


Figura 2. Referencias anuales de pez cebra en Pubmed. El aumento del uso del pez cebra en investigación ha tenido un incremento notable en las referencias al mismo en Pubmed, desde el año 1990 hasta el 2016.

A pesar de las diferencias obvias entre la fisiología de los humanos y de los peces, *Danio rerio* se trata de un modelo eficaz alternativo a la experimentación con animales vertebrados más desarrollados y con mayor percepción al dolor (6).

Una comparación directa entre los genes codificantes en humanos y en pez cebra revela un aspecto muy relevante: el 71,4% de los genes humanos poseen al menos un ortólogo en el pez cebra (los genes ortólogos se definen como aquellos que se encuentran en diferentes especies y que son altamente similares debido a que se han originado en un antepasado común) (10).

Además, otras son las características que convierten al pez cebra en un buen modelo de experimentación:

- I. El coste de mantenimiento es considerablemente menor al de un mamífero.
- II. El sistema cardiovascular, nervioso y digestivo son similares a los mamíferos (8).
- III. La tasa de fecundación es alta; cada hembra sexualmente madura puede producir una media de entre 200 y 250 huevos por apareamiento y el apareamiento no es estacional.
- IV. El proceso de embriogénesis es muy rápido; el cuerpo se desarrolla por completo a las 24 hpf y la mayoría de órganos internos como el corazón, hígado, riñón e

intestino se han desarrollado completamente a las 96 hpf. La madurez sexual se alcanza en el corto periodo de 3-4 meses.

- V. Las larvas son transparentes, lo que permite la visualización de los órganos, tejidos y células *in vivo*.
- VI. Los embriones de pez cebra son útiles para testar compuestos disueltos en agua, haciéndolos muy útiles para el descubrimiento de nuevos fármacos.
- VII. El desarrollo de la respuesta inmunitaria innata se da a los 4 dpf. La respuesta inmunitaria adaptativa se desarrolla por completo en torno a las 4-6 semanas post-fecundación.
- VIII. Existe un amplio conocimiento de la biología básica del pez cebra y su genoma está totalmente secuenciado, lo que posibilita la disponibilidad de *microarrays* comerciales.
- IX. El pez cebra es susceptible de análisis molecular y genético mediante la determinación rápida de la expresión génica temporal y espacial; el examen de la función genética específica mediante el desarrollo transgénico y la mutagénesis a gran escala.

Si se compara el pez cebra frente al ratón (el modelo animal más común usado en experimentación), se pueden encontrar diversas ventajas (Fig 3)

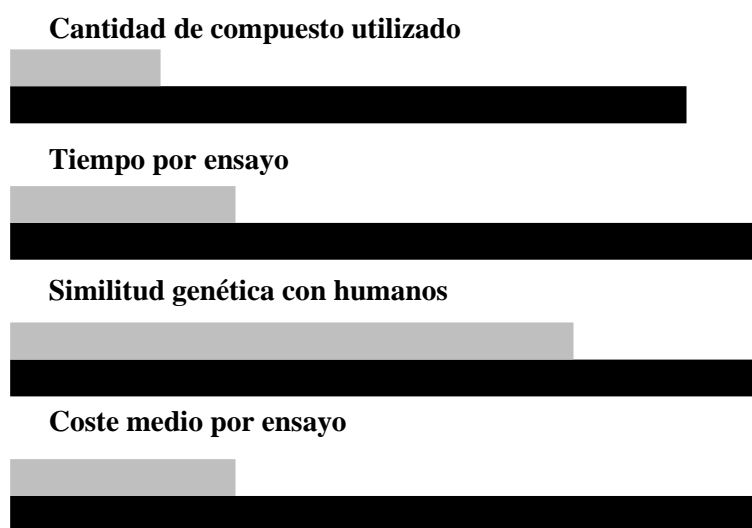


Figura 3. Pez cebra vs ratón. El gráfico de barras representa en unidades de porcentaje, las ventajas del pez cebra (gris) frente al ratón (negro).

1.2.3 Pez cebra y medicina personalizada

Uno de los retos actuales de la medicina, es el desarrollo de la llamada *medicina personalizada*, la cual consiste en el desarrollo de terapias individualizadas específicas para aquellos pacientes en los que los tratamientos disponibles no son efectivos (Fig. 4). En este contexto, el pez cebra ha ganado mucha popularidad, ya que ha demostrado ser útil como modelo para entender el desarrollo órgano-celular, mecanismos moleculares de enfermedades, descubrimiento de nuevos fármacos, y ensayos de toxicidad. Todas estas características convierten al pez cebra en un prototipo potencial para la replicación de enfermedades humanas y para la medicina de precisión (6).

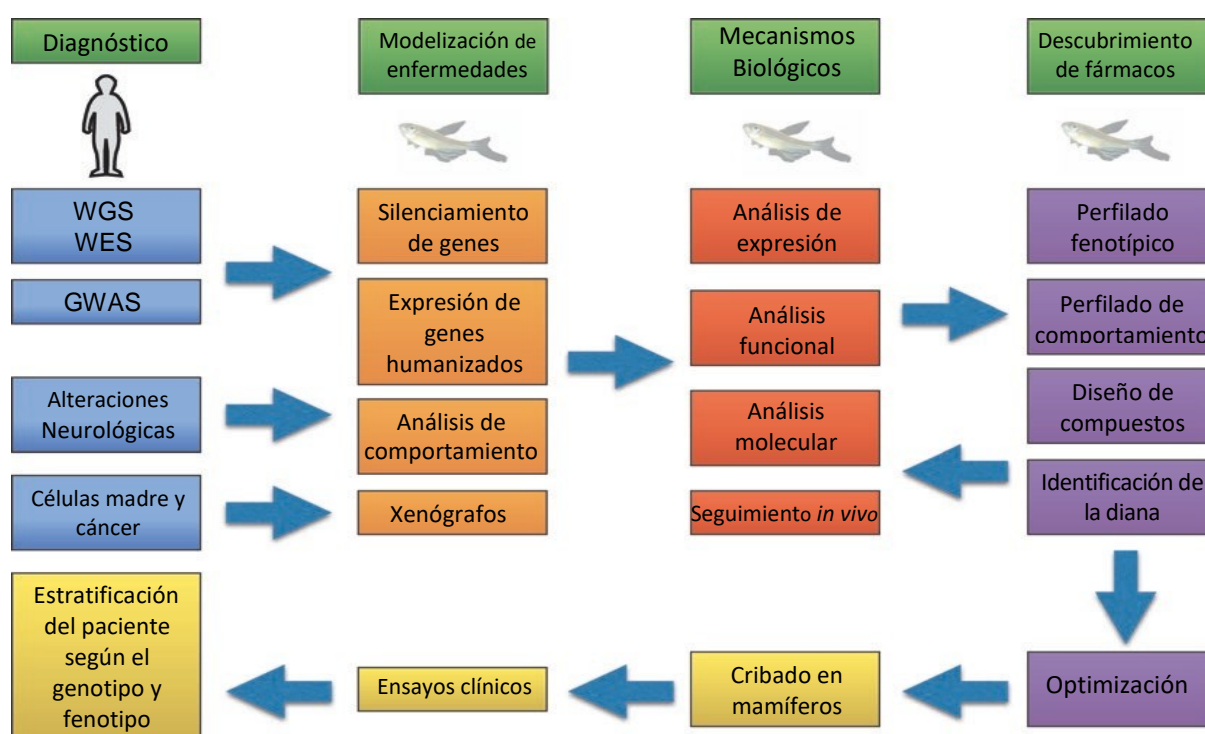


Figura 4. Descripción general de la posición del pez cebra en el desarrollo de la medicina personalizada. Teniendo en cuenta el diagnóstico en pacientes, el pez cebra puede ser usado como modelo biológico de enfermedad. La columna azul hace una referencia general a diversas enfermedades: genéticas, raras, alteraciones neurológicas, alteraciones de células madre y cáncer. La columna naranja hace referencia a diferentes mecanismos por los cuales se puede modificar la expresión de una enfermedad, tales como silenciamiento y sobre-expresión de genes, xenotrasplante, análisis de comportamiento. La columna roja indica los métodos por los que se puede analizar la enfermedad: análisis de expresión funcional y molecular, y seguimiento *in vivo*. La columna morada identifica métodos por los cuales se podría realizar una búsqueda de tratamiento. Los cuadros amarillos indican el proceso del por el cual se hace posible la implantación de un tratamiento para llevarlo a la práctica clínica: cribado en mamíferos, ensayos con pacientes, estratificación de pacientes. Figura adaptada de Baxendale S, 2017 (11) .

El recurso que ha hecho en mayor medida posible la introducción del pez cebra en el foco de la medicina de precisión ha sido la base de datos *The Zebrafish Model Organism Database* (ZFIN; <https://zfin.org>). Esta plataforma proporciona información actualizada (manualmente anotada y revisada) acerca de la genética, fenómica, genómica, referencias a otras bases de datos, así como una lista de publicaciones sobre estudios de enfermedades humanas descritas en el pez cebra (12,13).

1.2.4 Pez cebra *absolute*

El entendimiento de procesos como la progresión tumoral, ha estado restringido debido a la imposibilidad de realizar un seguimiento a tiempo real en un modelo animal. Una de las características que convierten al pez cebra en un buen modelo de laboratorio, es que en estado larvario es transparente, lo cual combate esta limitación. Sin embargo, debido a la opacidad del pez en estado adulto, los experimentos se veían acotados a la embriogénesis.

El desarrollo completo de los melanocitos en el pez cebra no se completa hasta la semana 6-7 post-fecundación. La piel de este ejemplar sufre una coloración progresiva a cargo de diferentes tipos de células de la cresta neural entre las que se incluyen xantóforos amarillos, iridóforos reflectantes y melanocitos negros o melanóforos (14–16) (Fig. 5).

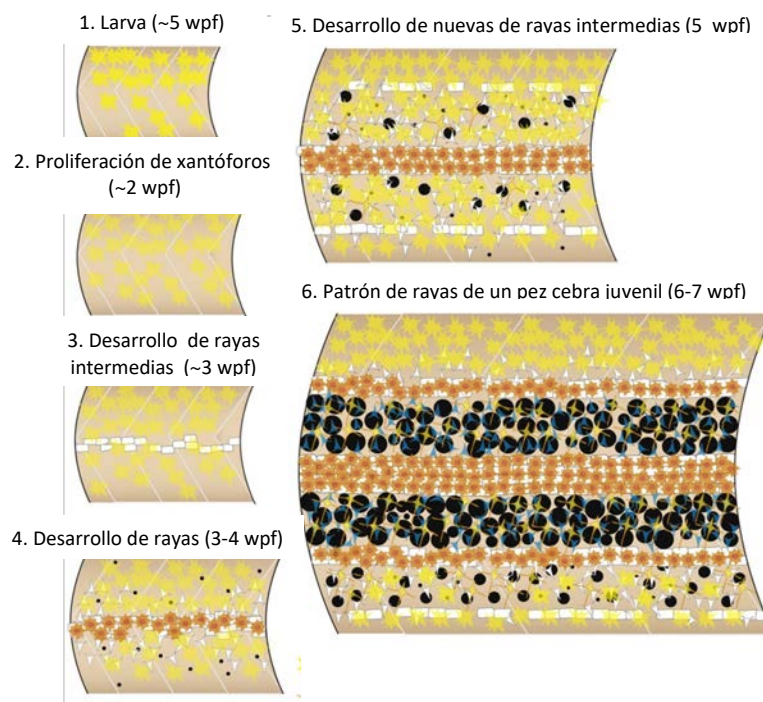


Figura 5. Patrón de pigmentación del pez cebra. Figura adaptada de del artículo Singh AP, 2015 (15).

Procedimientos de ingeniería genética, han conseguido silenciar con éxito los genes encargados de la pigmentación de la piel de *Danio rerio* (Fig. 6). El modelo conocido como *nacre*, posee una ausencia total de melanocitos debido a una mutación en el gen *mitfa* (17). El modelo *roy orbison* (*roy*) se trata de un mutante espontáneo, con ausencia completa de iridóforos, ojos pigmentados y piel translúcida con melanocitos dispersos. Este mutante es originado por un defecto en un intrón del gen *mpv17*, el cual codifica para una proteína de la membrana interna mitocondrial (17).

El modelo *casper*, se trata de un doble mutante para *nacre* y *roy*, que ha demostrado tener una ausencia total de melanocitos e iridóforos tanto en estado larvario como adulto (14).

La línea mutante *absolute* doble mutante para *roy* y el gen *ednrba*, presenta las mismas ventajas fenotípicas que el modelo *casper*. Este prototipo de pez cebra, del mismo modo que *casper*, permite la visualización del corazón, la aorta, el tubo intestinal, el hígado, la vesícula biliar, e incluso áreas cerebrales. Adicionalmente, es posible observar la presencia de huevos en hembras adultas (14). El mutante *absolute* ha demostrado ser totalmente viable, además de producir una descendencia normal.



Figura 6. Comparación de la pigmentación del pez cebra. Se muestran dos ejemplares de pez cebra macho: *wild-type* (superior) y *absolute* (inferior).

1.3 Biología del pez cebra

1.3.1 Reproducción

El pez cebra se trata de una especie ovípara con fecundación externa y sin cuidados parentales. La madurez sexual se alcanza en el corto periodo de 3-4 meses. Las hembras con una tasa de fertilidad elevada hasta los 18 meses de edad, pueden liberar cientos de huevos en una sesión de desove individual. La vida fértil de los machos comprende desde los 3 hasta los 12 meses aproximadamente. Además, tal y como se ha comentado, la reproducción en esta especie se trata de un proceso no estacional (18).

En los peces teleósteos, el eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal ejerce el control sobre el ciclo reproductor (Fig. 7), siendo el sistema nervioso el encargado de recibir los estímulos ambientales (temperatura, fotoperiodo, feromonas, interacción social, etc.). Una vez la información llega al hipotálamo, éste induce la producción de hormonas que llegan a la hipófisis a través de axones neuronales, donde se inhibe o estimula la liberación de gonadotropina al torrente circulatorio. Ésta última induce la producción de esteroides en las gónadas, que lleva al crecimiento y maduración del animal y finalmente a la obtención de los gametos.

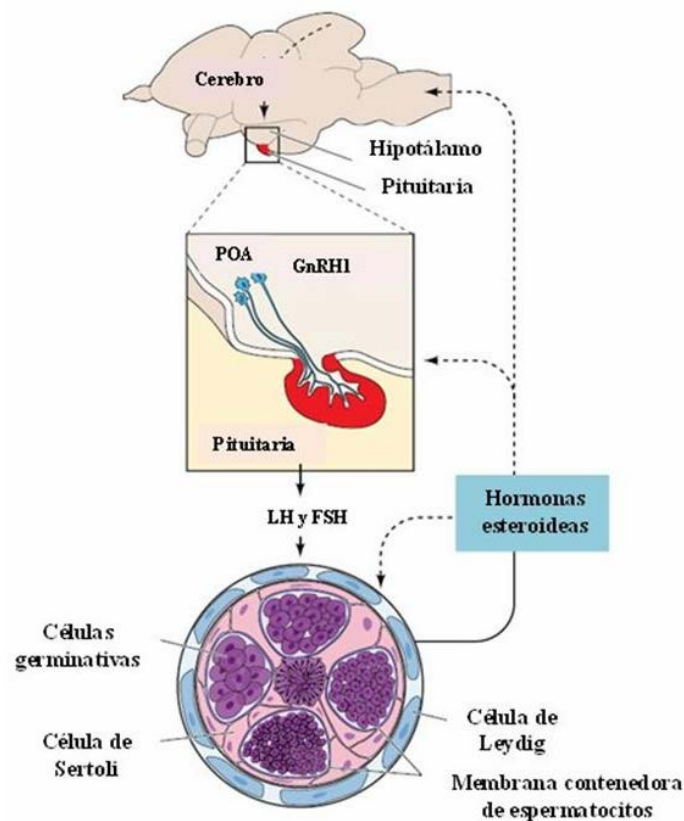


Figura 7. Eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal (macho). Figura adaptada de Maruska, K.P 2011(37).

En cuanto al apareamiento, la presencia de machos provoca la interacción social, así como el estímulo visual y olfatorio de las hembras induciendo la ovulación y la ovoposición. Tras la puesta, las hembras liberan feromonas que consisten en una mezcla de esteroides glucurónidos producidos en los ovarios para atraer a los machos y estimularles a expulsar el esperma y fecundar los huevos (19). El desove es inducido por la temperatura, aunque la disponibilidad de alimento así como los ciclos de luz también actúan como señal para la cría (7).

En el laboratorio, es habitual la cría natural entre peces cebra. Sin embargo, en los últimos años las técnicas de cría artificial inducida hormonalmente se han convertido en una metodología para producir huevos y embriones de pez cebra a gran escala (20).

1.3.2 Embriones vs adultos

Los peces cebra se clasifican en tres estadios de acuerdo con su edad:

- Periodo larvario: tiene lugar la formación de órganos primarios, los cartílagos de la cabeza y las aletas. Se observan los latidos cardíacos, la circulación sanguínea, los movimientos corporales y diversas respuestas a estímulos mecánicos. Este periodo abarca aproximadamente hasta los 20 dpf.
- Juvenil: presentan características similares al adulto, salvo dimorfismo sexual, y el tamaño es menor. Este periodo abarca aproximadamente desde los 21 hasta los 60-70 dpf.
- Adulto: se considera adulto a partir de los tres meses, período en que alcanza la madurez sexual y hay un claro dimorfismo sexual.

El estudio de los diferentes procesos biológicos, así como del desarrollo de enfermedades en los estadios tempranos del pez cebra resultan más sencillos que en su forma adulta. Esta ventaja se debe principalmente a que los embriones son ópticamente transparentes y carecen de sistema inmune desarrollado. Gracias a estas dos características, es posible realizar ensayos con fármacos, células cancerosas y células madre sin que el organismo lo detecte como extraño, además de detectar cambios tanto a nivel morfológico como fenotípico sin sacrificio debido a que se puede hacer un seguimiento visual. Adicionalmente, su pequeño tamaño permite manejarlos en placas de 6, 12, 24, 96 y hasta 384 pocillos.

Si se combina el hecho de trabajar con embriones, y que estos sean transparentes en estadio tanto larvario como adulto, el abanico de ensayos disponibles en el pez cebra se hace más grande (Fig. 8). Sin embargo, el coste de un pez transparente *absolute* frente a uno *wild-type* (fenotipo silvestre) es notablemente superior. Una solución a este problema sería la optimización de la reproducción artificial y cría asistida del pez cebra, de modo que pudiesen obtenerse tantos embriones del fenotipo deseado como se necesite.

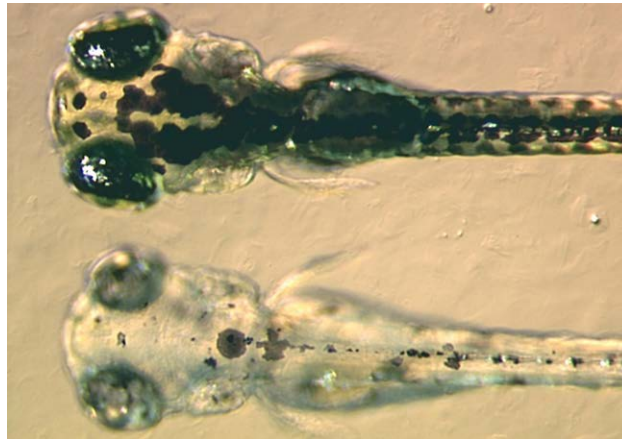


Figura 8. Larvas de pez cebra. La larva superior de coloración oscura corresponde al fenotipo *wild-type* y la larva inferior presenta un fenotipo mutante transparente (21).

1.3.3 Inducción hormonal reproductiva del pez cebra

Las principales ventajas de la hormonación reproductiva artificial en peces, además de conseguir embriones viables fuera del ciclo natural de puesta, es la sincronización de la ovulación y producción de espermia incrementando la eficacia de fertilización de los huevos. También se facilita la recolección de los huevos, todo ello en condiciones relativas de asepsia.

En el campo de la acuicultura y la cría de peces ciprínidos en el laboratorio (como es el caso del pez cebra) la estimulación hormonal es una práctica habitual. Para ello el fármaco de interés se disuelve en una solución y se suministra al animal en una o varias dosis (22,23).

Según la literatura, existen al menos cuatro formas de administración del fármaco en peces:

1. Inyección intraperitoneal, en la zona del abdomen debajo de la aleta ventral. (22).
2. Inyección intramuscular, en el músculo dorsal (24).
3. Inyección en la cavidad pericárdica (25).
4. Inyección intravenosa mediante la punción en la vena caudal (26).

En la familia de los ciprínidos así como en otras especies de teleósteos, la gonadotropina es el regulador central de la vía reproductora y la cascada de señalización hormonal mediante la síntesis y liberación de la hormona luteinizante desde la glándula pituitaria (27).

La dopamina, una monoamina de tipo catecolamina, se trata del único neurotransmisor conocido con un efecto inhibitor sobre la secreción de la hormona luteinizante en los teleósteos (28). Por tanto, si se combinan análogos de la gonadotropina con inhibidores de la dopamina, se consigue potenciar de forma efectiva la vía hormonal de los peces.

Antiguamente, el método más común para inducir la hormonación en peces de agua dulce, era la inyección de extracto de pituitaria de carpa (23,24). Este método es una alternativa viable al uso de hormonas sintéticas para inducir la producción de la hormona de crecimiento y secreción de gonadotropina.

Por tanto, una estrategia basada en terapias de inducción hormonal reproductiva en ciprínidos como *Danio rerio*, podría contemplar el uso de antagonistas de la dopamina, como la domperidona, metoclopramida y el halopedirol, junto a la gonadotropina o el extracto de pituitaria de carpa.

2. Hipótesis y Objetivos

El pez cebra (*Danio rerio*) es considerado un modelo animal útil para la medicina personalizada, aunque debido a la opacidad del pez en estado adulto, los experimentos se veían limitados a la embriogénesis. El modelo de pez cebra *absolute* ofrece la ventaja relativa a la transparencia en estadio adulto, permitiendo la realización y el seguimiento de estudios *in vivo*.

Sin embargo, el coste económico de una pareja de peces adultos de fenotipo *absolute*, frente a una pareja de fenotipo *wild-type* es 10 veces superior. Una posible solución a este problema sería la cría artificial a gran escala de peces *absolute* en el laboratorio.

Debido a la versatilidad de los peces cebra de fenotipo *absolute* en investigación, sería de gran utilidad la implantación de la cría artificial en el laboratorio de peces a gran escala, garantizando la eficacia en la obtención de embriones y el mantenimiento de las múltiples puestas, así como la reducción costes. Según la hipótesis planteada, los **objetivos** del proyecto son los siguientes:

Objetivos generales

1. Evidenciar la utilidad de *Danio rerio* como organismo modelo en investigación, así como su biología, cuidado y mantenimiento.
2. Analizar y evaluar la calidad y supervivencia de las puestas en la cría natural de peces cebra (*absolute* y *wild-type*).

Objetivos específicos

1. Estudiar la vía hormonal reproductiva del pez cebra y buscar fármacos agonistas y antagonistas que la potencien.
2. Desarrollar e implantar un protocolo estandarizado de cría artificial inducida hormonalmente.

3. Materiales y Métodos

Todos los resultados y datos obtenidos en los que se utilizaron ejemplares de pez cebra fueron registrados de acuerdo con la normativa ética vigente. Además, se siguieron rigurosamente las normas del Comité de Ética de la Empresa. Las medidas de seguridad a tener en cuenta en el animalario pretenden principalmente evitar los riesgos derivados de la manipulación de animales (enfermedades infecciosas).

Así mismo, todos los procedimientos que requerían la manipulación de peces adultos fueron realizados por la técnico del animalario, quién tiene posesión vigente del título de experimentación animal A+B+C (cuidado de los animales (categoría A), eutanasia de los animales (categoría B), realización de los procedimientos (categoría C). En todo momento pude ver y seguir este tipo de procedimientos.

En lo que concierne a experimentación con embriones (1-5 días post-fecundación), fueron realizados por mí misma y supervisado por la técnico especialista.

3.1 Animales

Para los procedimientos de cría artificial se emplearon peces cebra *wild-type* de edades comprendidas entre 3-6 meses como donantes de ovocitos y espermatozoides. Para la cría natural se emplearon peces adultos maduros sexualmente tanto del fenotipo *wild-type* como del *absolute*.

El peso aproximado de los animales fue de 300 ± 25 mg y la longitud de 3 ± 0.5 cm.

3.2 Mantenimiento y calidad del agua

Los peces adultos se mantienen separados por sexos en acuarios con una capacidad de 20 litros, con un máximo de 24 peces por tanque y una relación lumínica de 10:14h (luz:oscuridad). Además en cada pecera se incluye una planta artificial, ya que se ha demostrado que estas contribuyen al enriquecimiento de su hábitat en cautividad y a la mejora de la fertilidad (29).

En cuanto a la temperatura del agua, el rango aceptado es de $28,5 \pm 1^\circ\text{C}$. Esta es controlada mediante el uso de termómetros y un sistema de calentadores.

La instalación de peceras contiene un sistema de circulación de agua constante que permite filtrar el exceso de comida y excrementos de los peces, así como una correcta aeración. La optimización del agua (la cual puede ser de clorada o desionizada, en este último caso se añadan sales) se consigue a través de filtros de ósmosis, filtros de carbón activo (eliminación de compuestos químicos) y luz ultravioleta (eliminación de contaminantes biológicos). Así mismo los tanques son vaciados y limpiados en profundidad periódicamente.

En cuanto a la medida de la calidad del agua, se usa un test de calidad muy sencillo, con el que se consigue una evaluación rápida con un *Smartphone* (*JBL ProScan*) (Fig. 9). Consiste en sumergir la tira de test en el agua del acuario, colocarla sobre la escala de colores para el análisis, y escanear la escala de colores con un teléfono móvil. En la pantalla del móvil se muestran los parámetros del agua. Este método permite determinar la dureza total, la dureza de carbonatos, el pH, los nitritos, los nitratos, el cloro y el CO₂, que se analizan respecto a unos valores de referencia.



Figura 9. Sistema utilizado para medir la calidad del agua.

De acuerdo a los resultados obtenidos con este test respecto a los rangos de referencia (Tabla 2), se elaboran semanalmente los ficheros de “Evaluación de los parámetros de calidad del agua”.

Parámetro	Rango óptimo
Temperatura (°C)	28.5 ± 1
pH	7.3-7.5
Dureza CaCO ₃ (KH/°d)	6-15
Dureza Total (GH/°d)	4-20
Conductividad (mS)	<1
Potencial Redox (mV)	<0.3
% Oxígeno disuelto (mg/L)	80-100
Dióxido de Carbono (mg/L)	0-80
Nitratos (mg/L)	0-75
Nitritos (mg/L)	0-0.5
Cloro (mg/L)	0-0.8

Tabla 2. Tabla. Rangos óptimos de los parámetros de calidad del agua.
Los registros de calidad del animalario son controlados semanalmente.

3.3 Alimentación

El pez cebra se trata de un organismo omnívoro. Durante los primeros 5 días de estado larvario, el pez cebra subsiste mediante el consumo de su propio saco vitelino. En cautividad, una vez las larvas salen del huevo, requieren alimentación externa (pudiendo ser comida seca o alimento vivo). El tamaño de la comida debe de ser de ~100 µm para larvas y ~300-400 µm para peces adultos. La sobrealimentación puede influir negativamente en la calidad de la reproducción y en la viabilidad. Así mismo el exceso de comida afecta a la calidad del agua ya que precipita favoreciendo la aparición de hongos y el aumento de amonio, altamente tóxico.

- Comida seca. La dieta procesada comercial está compuesta por materiales biológicos, y se encuentra en forma de gránulos. Los animales se alimentan según su estadio, suministrando alimento de plancton para las crías (*Sera Micron*) y *Gemma* 0,8 (*Skretting*, España) a los juveniles y adultos. La alimentación tiene lugar 3 veces al día (aproximadamente a las 9:00; 13:00 y 17:00) y la cantidad suministrada es más o menos constante mediante el uso de un dispensador.

- Comida viva. La dieta de las larvas y los peces juveniles se complementa con alimento vivo. Esta se compone de rotíferos de la especie *Brachionus plicatilis* diluidos en agua desionizada. La cantidad de rotíferos suministrada es de 3 ml de la solución 3 veces al día al igual que el alimento seco.

3.4 Cría natural

La viabilidad y reproducción del pez cebra está muy influenciada por factores como el tipo de alimentación, la higiene, el estrés, y la iluminación. La calidad de la puesta dependerá por tanto de dichas condiciones.

La preparación de los tanques de cría tiene lugar el día anterior a la puesta. El número habitual tanques usados cada día es de 8 (este número es modificado en función de las necesidades del laboratorio). Para ello se seleccionan los machos ($n=2/3$) y las hembras ($n=2$) y se mantienen en tanques a $\sim 28^{\circ}\text{C}$ separados por sexos mediante una barrera. Los peces no son alimentados hasta que finaliza el apareamiento, momento en que son devueltos a sus respectivos acuarios. La estimulación a la cría se da con el comienzo de luz y el levantamiento de la barrera.

Es necesario que los tanques de apareamiento y cría sean específicos para ello o estén acondicionados, ya que los peces adultos devoran sus propios huevos. Debido a ello la pecera se divide en dos por una especie de colador. Los peces se encuentran en la parte superior, y los huevos se filtran hacia el fondo del tanque (Fig. 10).



Figura 10. Tanque de cría (*Tecniplast*).

Durante el cortejo el macho persigue a la hembra y le golpea la zona ventral con la parte caudal. Como consecuencia la hembra libera los cientos de huevos que alberga estimulando al macho a expulsar los espermatozoides que fecundan los huevos.

Tras el apareamiento ($\sim 2\text{h}$), se detecta la presencia de huevos ya fecundados en el fondo del tanque, y se devuelven machos y hembras a su pecera de origen. La recogida de los huevos tiene lugar mediante el uso de un colador con el que se filtra el agua de los tanques de apareamiento.

Una vez colados, se transfieren los huevos a una placa Petri (*Petri Dish*, Falcon) (~50 huevos por placa/60x15mm y ~200 huevos por placa placa/150x15mm) con medio E3 (medio E3→ se disuelven en 20 l de H₂O: 11,6 g NaCl (Sodio Cloruro AGR ACS, Labkem) , 0,53 g KCl (Potasio Cloruro AGR ISO,Labkem), 1,93 g CaCl₂ (Calcio cloruro dihidrato AGR ACS, Labkem) 3,26 g MgCl₂ (Magnesio cloruro hexahidrato AGR ACS, Labkem) y 2 ml de azul de metileno al 1%.

Los huevos fertilizados se conservan en las placas Petri en una incubadora a 28°C. Los ciclos de luz y oscuridad también son controlados.

Dependiendo del estado de salud y bienestar de las hembras, así como de otros factores desconocidos, estas producen huevos que pueden ser de diferentes tipos:

- Huevos viables (coloración transparente-amarillento, aspecto granular).
- Huevos no viables (coloración blanquecina, aspecto desintegrado).
- Huevos viables y no viables.
- Ausencia de huevos.

La diferenciación de los huevos necróticos de los viables se aprecia a simple vista mediante la observación de su aspecto (Fig. 11).

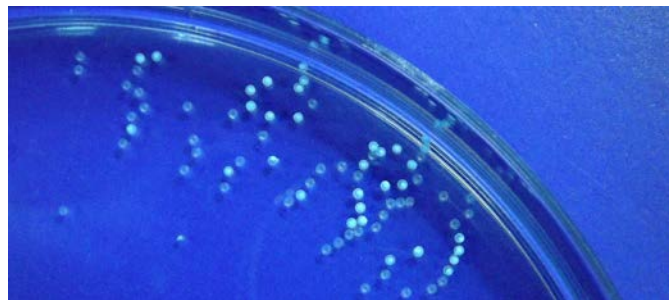


Figura 11. Aspecto de los huevos fecundados. Los huevos blancos están necróticos y los transparentes son viables.

3.5 Crecimiento de las larvas

Los huevos fertilizados se conservan en las placas Petri con medio E3 + azul de metileno durante las primeras 24 horas. Pasados 4 días, cuando las larvas ya han salido del huevo y son capaces de nadar libremente, son transferidas a un vaso de precipitados (30-40 larvas/vaso 250ml y 60-80 larvas/vaso 400ml).

El medio en el que se encuentran las larvas es sustituido a diario, así como la retirada de embriones muertos (coloración blanquecina) y los posibles desechos. La salinidad del medio se va aumentando progresivamente (~10%), conforme a la edad de las larvas (Tabla 2).

Medio utilizado	Edad de las larvas
E3 + azul de metileno	0 dpf
E3	1-3 dpf
E3 + 10% sales	4-11 dpf
E3 + 20% sales	12-13dpf
E3 + 30% sales	14-15 dpf
E3 + 40% sales	16-20 dpf

Tabla 3. Modificación de la salinidad del medio en etapa de larva del pez cebra. La primera columna indica el medio utilizado respecto la edad de las larvas (segunda columna) medida en días después de la fecundación.

3.6 Estudio bibliográfico de fármacos candidatos para la cría artificial

La selección de los posibles fármacos para inducir la estimulación hormonal reproductiva para la cría artificial de los peces cebra, se realizó mediante el análisis bibliográfico de compuestos agonistas y antagonistas que potenciasen la vía hormonal del pez.

Las casas comerciales de los distintos fármacos indicaban un rango de actuación óptima en cuanto a la concentración a administrar, así como diferentes medios en los que diluir cada compuesto (Tabla 3). Además, según la bibliografía, existían diferentes opciones de administración de los fármacos: en combinación o de forma separada.

Hormona	Concentración óptima	Disolvente
Extracto de pituitaria de carpa (EPC)	2-8mg/kg	Solución salina
<i>Ovopel Hungary</i>	~1 pellet/ml	Solución salina
Hormona luteinizante (LH)	5-10µg/kg	Cloruro de sodio
Haloperidol	0.1-1mg/kg	DMSO/Etanol
Gonadotropina coriónica humana (GCH)	165-600 unidades/kg	Agua desionizada

Tabla 4. Fármacos candidatos para la hormonación del pez cebra. En la primera columna se detalla el nombre completo del compuesto; la segunda columna indica el rango de concentraciones óptimo de cada compuesto; la tercera columna indica la solución en la que disolver el compuesto.

En este proyecto, únicamente se testó la hormona *Ovopel Hungary* debido al factor limitante del tiempo.

3.7 Cría artificial: Diagrama teórico

Previamente a la realización de los experimentos de cría artificial, se definió un diagrama teórico que recoge los conceptos clave para la validez interna de los procedimientos. Se basó en las pautas del Asistente de diseño experimental del Centro Nacional de las 3Rs de Reino Unido (<https://eda.nc3rs.org.uk/>).

En primer lugar, a la hora de establecer un protocolo de administración externa de un compuesto a un humano o animal, es obligatorio que el proceso sea seguro. Es decir, que el uso del fármaco en cuestión no produzca alteraciones de comportamiento, daño o muerte. Para ello se realiza un análisis cualitativo y cuantitativo del compuesto tras su administración en un grupo reducido de animales. De este modo es posible conocer el rango de concentraciones en el que obtener un efecto sin consecuencias negativas evitando la toxicidad.

A continuación, es necesario ajustar el tiempo desde que se inyecta el fármaco hasta que este ejerce el efecto deseado. En términos de farmacocinética, consistiría en la absorción, distribución y metabolismo de la hormona para conseguir el efecto buscado.

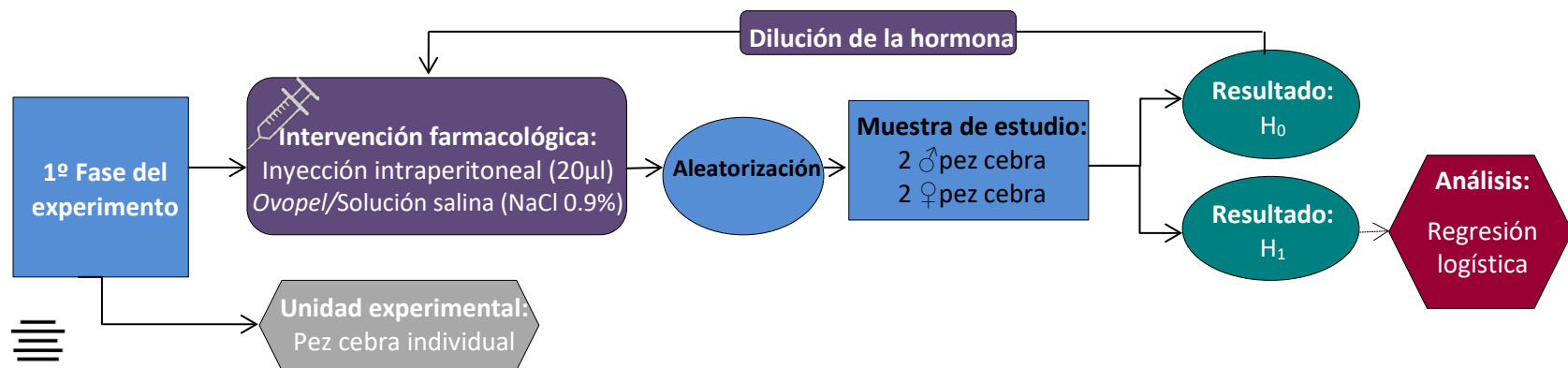
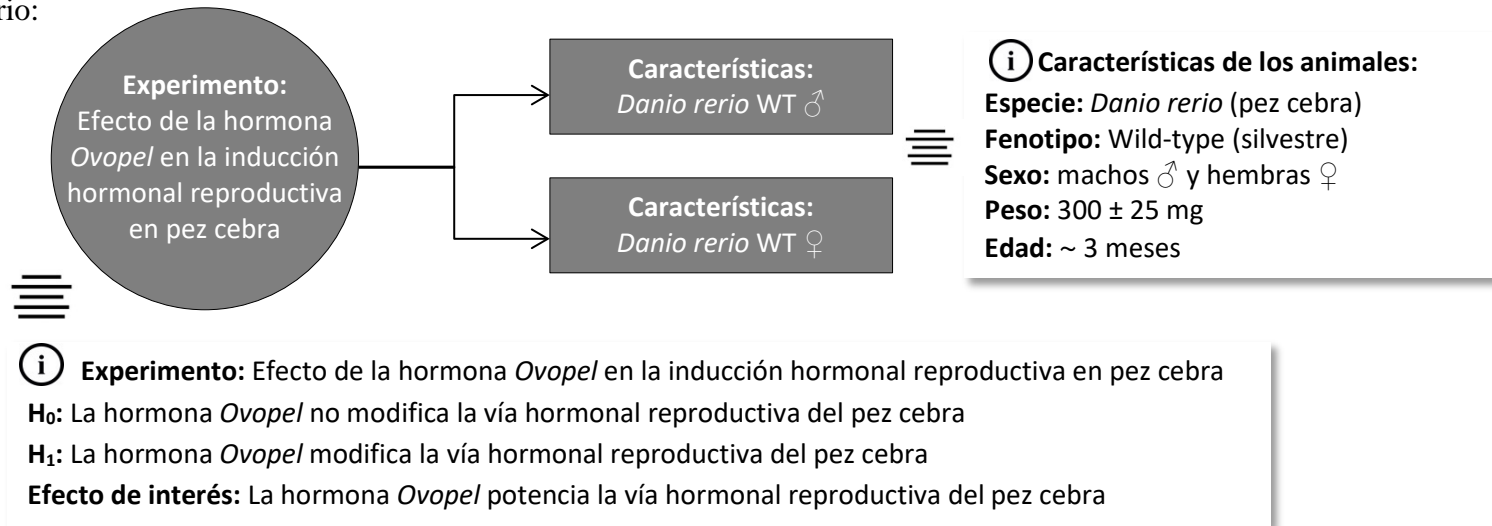
Una vez definido un fármaco como seguro, y tras conseguir el efecto deseado, se comparan diferentes compuestos con el fin de lograr una respuesta en el menor tiempo posible y con la menor cantidad de recursos.

Aplicando estos conceptos a la evaluación de la hormonación para la cría artificial en el pez cebra, la primera fase consistiría en lograr encontrar una concentración de fármaco que no implique letalidad. Para ello se determinó administrar la concentración máxima aconsejada por el fabricante, para poder realizar diluciones de una forma sencilla en el caso de que se viese alterado el comportamiento natural del pez o produjese su muerte. En esta fase el tamaño muestral debe de ser reducido para minimizar el número de muertes: 2 ejemplares de pez cebra macho y 2 hembras para cada concentración.

Tras establecer que la concentración administrada del fármaco es segura, la segunda fase consistiría en la realización de variaciones en cuanto al número de dosis inyectadas y a las horas de actuación de la hormona hasta obtener huevos y esperma.

Finalmente, en la tercera fase se debería de comparar el efecto de varias hormonas y seleccionar aquella con la mejor eficacia y efectividad.

A continuación, se muestra el diagrama teórico de la primera fase de experimentación de inducción hormonal reproductiva, llevada a cabo en el laboratorio:



Experimento: Administración de la hormona *Ovopel* en el pez cebra
H₀: La hormona *Ovopel* altera el comportamiento del pez cebra o conlleva a la muerte
H₁: La hormona *Ovopel* no altera el comportamiento del pez cebra ni conlleva la muerte
Efecto de interés: Determinar la concentración de *Ovopel* segura biológicamente a administrar en el pez cebra

3.8 Cría artificial: experimentación

Una vez establecido el diagrama teórico de cría artificial se procede a la experimentación. La dilución, el número de dosis y las horas de actuación de la hormona *Ovopel Hungary* se fue modificando siguiendo las pautas del diagrama teórico de experimentación. Esta información se detalla en las tablas de *Reproducción asistida pez cebra* del Anexo.

3.8.1 Preparatorio pre-inyección

La selección aleatoria de los peces a tratar tiene lugar el día anterior al procedimiento. Los machos y hembras son separados en peceras diferentes, y se mantienen en ayuno hasta que finalice el ensayo. La preparación de la solución hormonal tiene lugar inmediatamente antes de inyectarla para evitar que precipite.

3.8.2 Anestesia, Inyección y Recuperación

El MST también conocido como MS-222, 3-aminobenzoico etil éster metanosulfonato o simplemente tricaína, se trata de un anestésico altamente soluble en agua utilizado de forma general en peces. Aunque la tricaína es catalogada como un anestésico local, presenta un efecto de anestesia general en peces, absorbiéndose a través de las branquias (30).

De acuerdo con el protocolo de ZFIN (<https://wiki.zfin.org/display/prot/TRICAINE>), se preparó una solución stock de tricaína añadiendo 400 mg de la misma a 97.9 ml de agua destilada, ~2.1 ml 1 M Tris (pH 9) y se ajustó el pH a 7. La solución usada como anestésico se preparó a partir del stock, añadiendo 4.2 ml del misma y ~100 ml de agua en un vaso de precipitados de 250 ml. El modo de anestesiar al pez, fue mediante la sumersión del mismo en el vaso con tricaína. El tiempo de pérdida del movimiento corporal y ausencia de respuesta a estímulo mecánico externo es de ~40-50 segundos.

Una vez que el animal está anestesiado y tras la esterilización de los guantes con etanol 70%, se coloca con el abdomen hacia arriba en una superficie plana limpia (servilleta). De forma cuidadosa se introduce la aguja (Jeringa Insumed 0,3 ml insulina con aguja 31G 0,25 x 8 mm, *Pic Solution*) en la zona intraperitoneal, concretamente en la línea media entre las aletas pélvicas (Fig. 12). Se inyectan 20 μ l de la solución hormonal y se retira suavemente la aguja. A continuación, se devuelve el pez al tanque de recuperación; en unos segundos suele comenzar a nadar de nuevo.



Figura 12. Inyección intraperitoneal en el pez cebra. La aguja se introduce por la parte inferior de la aleta ventral.

3.8.3 Extracción del esperma y de los huevos

La extracción del esperma y de los huevos de los peces cebra se realizó siguiendo el protocolo de la IACUC (Institutional Animal Care And Use Committee).

Entre 22 y 24 horas tras la administración del fármaco, se procede a la extracción del esperma de los peces macho. Para ello, se anestesian a los animales con tricaina. Además, es muy importante evitar contaminaciones de orina, heces o mucus secado suavemente la zona abdominal con una servilleta de papel. A continuación, se realiza un masaje abdominal mientras que se succiona el área urogenital con una pipeta *pasteur* (1 ml).

El semen obtenido se diluye en 500 μ l de *Han's stock #1 solution* (http://cshprotocols.cshlp.org/content/2007/8/pdb.rec11072.full?text_only=true). Desde su extracción, hasta su utilización (tiempo máximo de 3 h), esta solución se debe mantener en condiciones adecuadas de oxigenación y temperatura (4°C).

Entre 22 y 24 horas tras la administración del fármaco, los peces hembra presentan el abdomen abultado indicando la presencia de huevos. Para su extracción, se procede al anestesiado de las hembras con tricaina. Los huevos son expulsados fácilmente mediante la presión abdominal del pez. Inmediatamente después se recogen en una placa Petri limpia y seca, y se recubren con la solución que contiene el esperma. A continuación, se cubren los huevos con solución E3 + metileno evitando movimientos bruscos. Los huevos se activan por contacto con el agua y son fecundados por la acción del esperma. La fertilización de los huevos tiene lugar de forma muy rápida, entre 20 y 60 segundos. La placa se conserva en la incubadora a $28,5 \pm 1$ °C.

Es posible que las hembras produzcan y reabsorban sus huevos de forma natural cada día, ya que su ritmo circadiano está sincronizado para liberar los huevos con las primeras horas de luz. De este modo, antes de inyectar el fármaco a los peces cebras hembra, hay que asegurarse de la ausencia de huevos.

Después de que los peces hayan sido intervenidos para experimentos *in vitro*, deben de reposar durante un tiempo de 3-4 semanas antes de volver a ser utilizados tanto como para cría natural como artificial.

3.9 Eutanasia

En el caso de que los animales presentasen síntomas de enfermedad o dolor, se procede a la eutanasia para evitar el sufrimiento de los mismos. El procedimiento para eutanasiar consiste en la sobreexposición a triclaína. Se debe de reconocer la muerte del animal por el cese de la respiración (movimiento opercular) y del latido cardíaco.

3.10 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa *R-Studio 3.4.3*.

La comparación de la calidad de las puestas por cría natural entre los fenotipos *wild-type* y *absolute* se analizó con el Test de Wilcoxon para dos muestras independientes. La supervivencia por sexo tras la administración de *Ovopel* se analizó mediante el test para la diferencia de proporciones. La proporción de peces vivos (total de machos y hembras) frente a la dilución de la hormona se ajustó mediante una curva de regresión logística.

Se consideraron significativos aquellos valores con una $p < 0.05$.

4. Resultados

4.1 Mantenimiento y calidad del animalario

Con el fin de que el estado de bienestar y salud de los peces sea el óptimo, las condiciones de limpieza y calidad del animalario son revisadas con rigurosidad.

De acuerdo a los resultados obtenidos con el test de calidad del agua y la medida de la temperatura de las baterías de peceras, se elaboran semanalmente unos ficheros de datos que permiten realizar un seguimiento del animalario con el fin de implantar medidas correctoras en el caso de que sea necesario.

A continuación, se presenta el fichero de datos que recoge la evaluación de los parámetros de calidad del agua correspondiente al último trimestre del 2017 (Tabla 5). De acuerdo con la leyenda, los colores indican si los datos valorados se encuentran en estado óptimo (verde), tolerable (amarillo) o si es necesario aplicar medidas correctivas (rojo).

Como se observa en la tabla, hubo variaciones en los valores normales de nitritos (NO_2), dureza del agua (CaCO_3) y de la temperatura. Los demás parámetros evaluados se mantuvieron dentro del rango óptimo.

El aumento en los niveles de nitritos puede ser debido al acúmulo de restos de alimento que quedan en el fondo y los filtros de las peceras, que incrementan los niveles de nitrógeno y con ello la toxicidad del agua. Este parámetro se corrigió mediante la rigurosidad de la limpieza de los acuarios y el aumento de control en la cantidad de alimento suministrado.

La dureza del agua es debida a la presencia de iones carbonato o bicarbonato disueltos en el agua. En gran parte, la capacidad tampón del agua para mantener el pH constante es debida a estos compuestos. El aumento de la dureza implica la formación de precipitados de carbonato cálcico que dan lugar a las llamadas costras calcáreas o cal. Se corrigió con un equipo de ósmosis inversa (*Aguabona*). La disminución de la dureza se traduce en la desmineralización del agua; se corrigió mediante la adición controlada de sales de bicarbonato sódico.

La variación en la temperatura se corrigió mediante el reajuste de los calentadores del agua.

	NO ₃ (mg/L)	NO ₂ (mg/L)	Dureza total (GH°d)	Dureza CaCO ₃ (KH°d)	pH	Cl (mg/L)	CO ₂ (mg/L)	Temperatura (°C)	Conductividad (mS)	Redox (mV)	O ₂ (mg/L)
06/10/2017	25	0,5	7	20	7,2	0	35	29,1	0,7	313	100
10/10/2017	25	0,5	7	20	7,2	0	35	27,9	0,7	319	100
20/10/2017	18	0,25	7	20	7,4	0	20	27,8	0,8	324	100
27/10/2017	18	0	7	8	7,2	0	15	28,2	0,8	318	100
10/11/2017	25	0	14	6	7,4	0	15	28,5	0,8	320	100
17/11/2017	25	0	14	8	7,2	0	15	28,6	0,7	323	100
24/11/2017	25	0	7	6	7,2	0	15	28,2	0,8	319	100
15/12/2017	40	0	14	8	7,4	0	15	28,3	0,8	315	100
22/12/2017	25	0	7	8	7,4	0	15	28,2	0,8	317	100

Tabla 5. Registro de la calidad del agua.

Leyenda:

ÓPTIMO
TOLERABLE
APLICAR MEDIDAS CORRECTIVAS

4.2 Cría natural: Análisis de la viabilidad y supervivencia de las puestas

La información referente a la trazabilidad de la cría natural en peces *wild-type* y *absolute* se detallan en el apartado "Trazabilidad de cruces de pez cebra" incluido en el Anexo. Estos datos detallan información en cuanto a: el fenotipo del pez, la fecha de la puesta, el número de tanques de apareamiento usados, el número de peces por tanque, el éxito del cruce por pecera, el número de huevos totales diarios, y la viabilidad de la puesta a las 24 horas. La anotación y revisión de los datos permite poder realizar un seguimiento exhaustivo de la calidad y la viabilidad de las puestas, así como de la fertilidad de los distintos peces.

Para evaluar el éxito de la cría natural en *Danio rerio*, se analizaron las puestas de los peces tanto de fenotipo *wild-type* como *absolute* del último trimestre del 2017. Para ello, se calculó la viabilidad de los huevos fecundados mediante el cociente de los huevos viables a las 24 hpf entre el total de ovocitos que fueron fecundados inicialmente, para cada uno de los grupos.

Durante el último trimestre de 2017, hubo un total de 27 puestas del fenotipo *absolute* con una tasa de viabilidad media del 40,74 %. A continuación, se representa el porcentaje de huevos vivos por cada puesta individual:

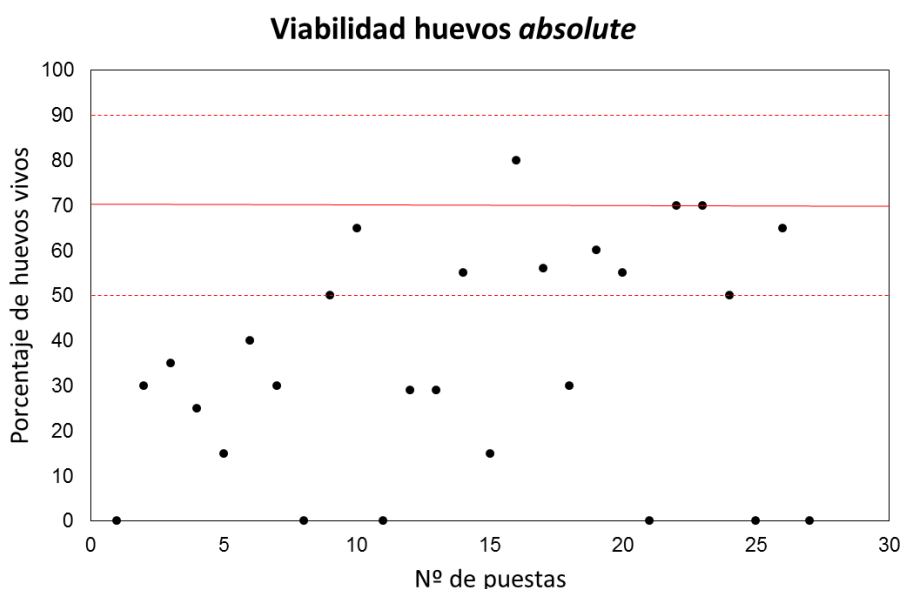


Figura 13. Viabilidad de los huevos de fenotipo *absolute* durante el último trimestre de 2017. Los puntos negros indican el porcentaje de huevos vivos en cada una de las puestas. Las líneas rojas representan los intervalos de viabilidad media de los huevos en condiciones óptimas (entorno al 70 ± 20 %).

Durante el último trimestre de 2017, hubo un total de 48 puestas del fenotipo *wild-type* con tasa de viabilidad media del 62,5 %. A continuación, se representa el porcentaje de huevos vivos por cada puesta individual:

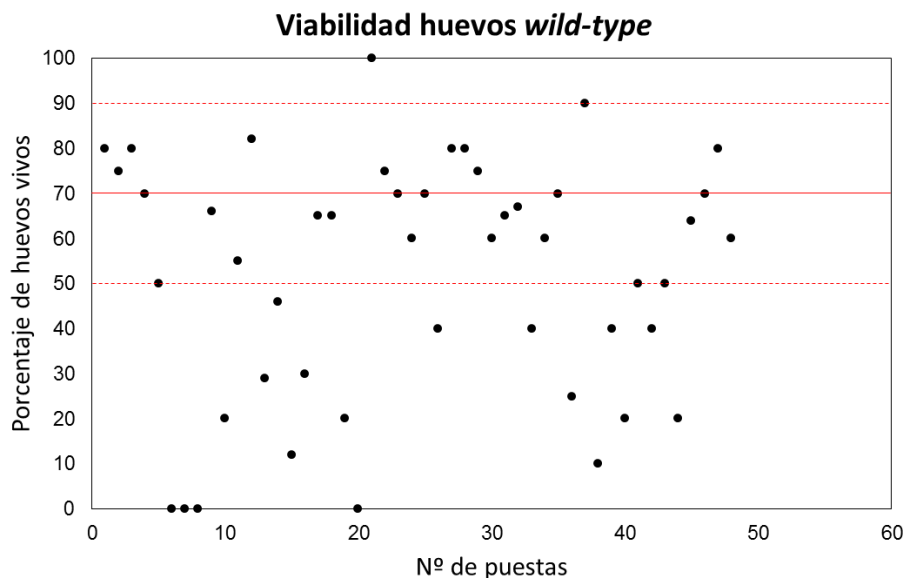


Figura 14. Viabilidad de los huevos de fenotipo *wild-type* durante el último trimestre de 2017. Los puntos negros indican el porcentaje de huevos vivos en cada una de las puestas. Las líneas rojas representan los intervalos de viabilidad media de los huevos en condiciones óptimas (entorno al $70\pm 20\%$).

Los datos referentes a las puestas por cría natural, revelaron que la tasa de viabilidad de los huevos del fenotipo *wild-type* frente al fenotipo *absolute* (IC 95%) es significativamente mayor ($p < 0,05$). (Test de Wilcoxon para dos muestras independientes).

4.3 Cría Artificial

Para analizar los efectos de la inducción hormonal reproductiva en *Danio rerio*, se procedió a la administración y evaluación del compuesto *Ovopel Hungary* en un total de 72 ejemplares (36 machos y 36 hembras). Esta técnica se llevó a cabo en peces de la línea *wild-type* de edades comprendidas entre 3 y 6 meses, con un peso aproximado de 300 ± 25 mg y una longitud de $3\pm 0,5$ cm.

La información de cada procedimiento individual en relación a la dilución administrada de *Ovopel*, la hora de inyección, el número de dosis y el resultado obtenido, viene detallado en el apartado *Reproducción asistida pez cebra* en el Anexo.

De acuerdo con el diagrama teórico, la **primera fase** de experimentación consistió en encontrar la máxima concentración de hormona que no implicase efectos adversos en los peces (seguridad biológica). Para ello inyectaron 20 µl a partir de una disolución de 1 pellet de *Ovopel* (50-55 mg) y 1 ml de solución salina (NaCl 0,9%). La muestra se fue diluyendo mediante la adición de solución salina en intervalos de 0,25 ml hasta 4,25 ml (se evaluaron un total de 14 diluciones diferentes de la solución hormonal).

El análisis de la proporción de peces vivos en machos y en hembras por separado (IC 95%) (test para la diferencia de proporciones), reveló que no existían diferencias significativas en la supervivencia entre ambos grupos ($p < 0,05$).

La proporción de peces vivos (total de machos y hembras) frente a la dilución de la hormona se ajustó mediante una curva de regresión logística. Los coeficientes del modelo revelaron la existencia de una interacción estadísticamente significativa en la supervivencia de los peces a medida que aumenta la dilución de *Ovopel* ($p < 0,05$). La curva se ajusta a la fórmula: $\text{logit}[\pi(x)] = \log(\pi(x)/1 - \pi(x)) = -4.611 + 1.592 x$

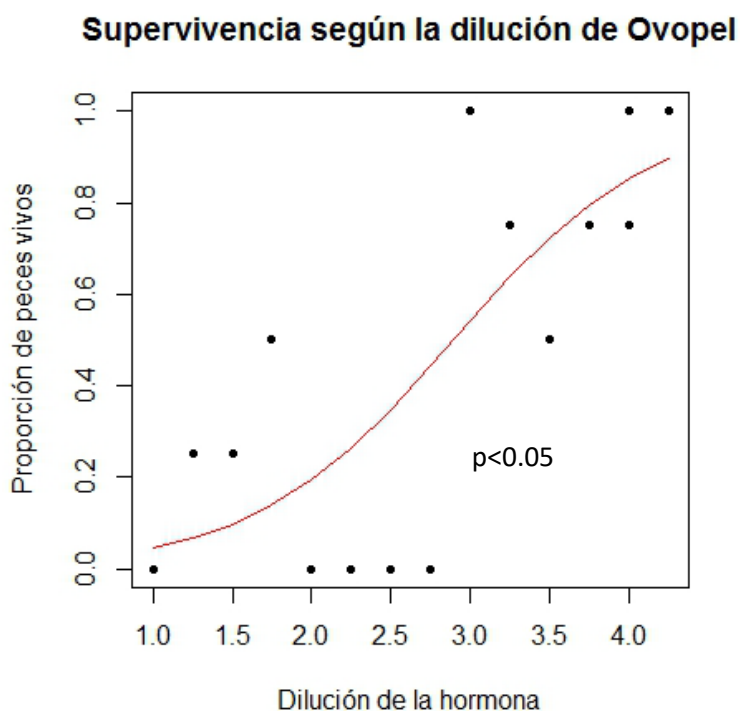


Figura 15. Supervivencia de *Danio rerio* según la dilución administrada de *Ovopel*. Modelo de regresión logística para el ajuste de la proporción de peces vivos frente a la dilución de la hormona.

Tras el ajuste del modelo, se determinó que la barrera de seguridad biológica se encuentra en la disolución formada por 1 pellet de *Ovopel* y 4 ml de solución salina (0.9%)

La **segunda fase** de experimentación consistió en la realización de variaciones en cuanto al número de dosis inyectadas y a las horas de actuación de la hormona hasta obtener huevos y esperma. De acuerdo con la bibliografía y tras varias pruebas, se determinó administrar 2 dosis de *Ovopel*, con un intervalo de 5 horas entre cada dosis.

La presencia de huevos y esperma se comprobó entre 22 y 24 horas después de la inyección de la hormona. De los que ejemplares que sobrevivieron, en el 80% de los machos se logró inducir el proceso de espermiación y en el 65,2% de las hembras se estimuló el proceso de ovulación.

Sin embargo, se requieren más experimentos para ajustar con precisión las horas de actuación del fármaco con el fin de aumentar el número de ejemplares en los que se induce con éxito la hormonación reproductiva.

5. Discusión

5.1 Mantenimiento y calidad del animalario

El buen estado del agua es el factor más importante para la salud y el bienestar de los peces. Una mala calidad del agua puede contribuir a la progresión de enfermedades y al estrés, afectando a la viabilidad y la cría (29). La limpieza y la supervisión de las condiciones de las peceras deben de ser rigurosos para que los ejemplares estén en condiciones óptimas.

De este modo, se consigue evitar la propagación de bacterias y hongos, que podrían alterar la salud de los peces, así como conseguir un entorno limpio para lograr el máximo bienestar de los ejemplares. El buen cuidado de las instalaciones se ve reflejado directamente en la fiabilidad y reproducibilidad de los experimentos.

Por tanto, el correcto mantenimiento del animalario, la limpieza y la realización de tests de calidad del agua, permiten el seguimiento de las condiciones del animalario con el fin de implantar medidas correctoras en el caso de que fuese necesario. La anotación y revisión de la información relativa al estado de las instalaciones al final de cada semana, es crucial para los controles internos de calidad y la implantación de mejoras (Tabla 5).

5.2 Cría natural

Un pez cebra hembra es capaz de poner huevos prácticamente a diario, pero si se somete todos los días al proceso de cría, el número y la calidad de los huevos se ve muy afectado. Respecto a los machos, la producción de esperma supone un coste metabólico menor que la ovulación, aunque posiblemente la calidad también se vea afectada si el apareamiento es diario. La evidencia sugiere que la cría de los peces cebra más de una vez cada dos días reduce el número y la viabilidad de las puestas. Por ello es recomendable el descanso de una semana entre ciclos de apareamiento (18,31).

En referencia a la viabilidad, una buena puesta se define como aquella que contiene entre 70 y 200 huevos, de los cuales entorno al 80% son fecundados, alcanzando una proporción aproximada de huevos viables del $70\pm 20\%$. Estos resultados se consiguen cuando las condiciones de bienestar de los animales son óptimas y estos han alcanzado la madurez sexual (32).

Pequeñas variaciones en la temperatura, la modificación de los ciclos de luz, la sobrealimentación, alteraciones en la calidad del agua o la cría excesiva, generan estrés en los ejemplares afectando de manera negativa a las puestas.

En cuanto a los resultados obtenidos en *Cría natural* en el último trimestre de 2017, la tasa de viabilidad media de los huevos de fenotipo *absolute* fue del 40,74 %. Este valor es inferior a la proporción aproximada de huevos viables según la bibliografía ($70\pm 20\%$ SD). La causa más probable de este hecho, es que la edad de los ejemplares *absolute* era 20 meses. Está demostrado que la tasa de fertilidad y la calidad de los gametos en el pez cebra comienza a deteriorarse alrededor de los 12-16 meses de vida; por ello la cría natural en condiciones óptimas va desde los 3-4 meses hasta el año (7).

La tasa de viabilidad media de los huevos de fenotipo *wild-type* fue del 62,5 %, un valor dentro del rango normal de viabilidad ($70\pm 20\%$ SD).

5.3 Posible implantación de la cría artificial en el laboratorio

De acuerdo con uno de los objetivos de este proyecto se estudió el ciclo reproductor en la especie *Danio rerio* con la intención de encontrar fármacos que lo estimularan hormonalmente para implantar la reproducción artificial en el laboratorio.

Debido a la limitación de tiempo, únicamente se testó la hormona *Ovopel*, descrita por la Universidad de Agricultura de Gödöllő, Hungría. *Ovopel* se trata de un agente cuyos principios activos son un oligopéptido análogo a la Gonadotropina y el antagonista dopaminérgico Metaclopramida (33).

Este compuesto está descrito en varias publicaciones en los que su funcionamiento en ciprínidos ha tenido resultados positivos (26,34–36). Sin embargo, por motivos de confidencialidad, la bibliografía no detalla con exactitud la concentración, la dosis, ni las horas de actuación del fármaco.

Por ello se definió un diagrama teórico para la cría artificial antes de realizar ningún procedimiento experimental (ver apartado 3.7 *Cría artificial: Diagrama teórico*). El buen diseño de un experimento permite la reducción del uso de animales además de dar rigor a los resultados.

Debido al tiempo acotado, los experimentos en los que se testó la hormona *Ovopel* se limitaron principalmente a conseguir seguridad biológica, es decir, encontrar la dilución del fármaco que no implicase alteraciones en el comportamiento natural de los peces ni muerte. La evaluación de los resultados reveló la seguridad en la inyección de dos dosis de 20 µl (con un intervalo de 5 horas entre cada dosis) de la disolución compuesta por 1 pellet de *Ovopel* y 4 ml de solución salina (0,9%).

Los peces que toleraron la dosis administrada, descansaron 3 semanas hasta ser sometidos de nuevo a procesos tanto de cría natural como artificial.

El ajuste con precisión de las horas de actuación del fármaco con el fin de maximizar el número de ejemplares en los que se induce con éxito la hormonación reproductiva, requiere ensayos más largos y con un tamaño muestral mayor.

Una vez optimizado el uso de *Ovopel*, se deberían de realizar ensayos de cría artificial con diferentes hormonas, ver apartado 3.6 *Estudio bibliográfico de fármacos candidatos para la cría artificial*, con el fin de lograr una respuesta en el menor tiempo posible y con la menor cantidad de recursos.

5.3 Cría artificial y peces cebra fenotipo *absolute*

Una de las características más destacable de *Danio rerio*, es que en estado larvario es transparente. Procedimientos de ingeniería genética han conseguido silenciar con éxito los genes responsables de la pigmentación del pez cebra. La transparencia del cuerpo permite la rápida evaluación de los órganos y tejidos del animal, y por tanto la realización de estudios *in vivo*, sin la necesidad de sacrificio (14).

Sin embargo, el coste medio de una pareja de peces *wild-type* (fenotipo silvestre) es de 40\$, mientras que el coste de una pareja *absolute* (fenotipo mutante transparente) se eleva a 400\$ (<https://zebrafish.org/documents/fees.php>).

La optimización del desarrollo e implantación de la cría artificial, permitiría la producción a gran escala de peces de fenotipo *absolute* en el laboratorio. Además, se conseguiría sincronizar la ovulación y producción de espermatozoides de los peces incrementando la eficacia de fertilización de los huevos. También se facilitaría la recolección estéril de los huevos.

Ovopel Hungary ha sido utilizado previamente en procedimientos de hormonación reproductiva en ciprínidos. El coste aproximado de 1 pellet de *Ovopel* (~90 peces) es de 1\$. Teniendo en cuenta que un pez cebra hembra pone una media de entre 70 y 300 huevos, parece rentable la cría artificial en el laboratorio de peces *absolute* frente a su compra.

Además, la puesta a punto de la cría artificial en el laboratorio, aumentaría la tasa de viabilidad y la calidad de las puestas (tanto en peces *absolute* como *wild-type*), rentabilizando recursos y tiempo.

6. Conclusiones

1. *Danio rerio* es un modelo animal en auge en la investigación biomédica, farmacológica y toxicológica.
2. El modelo de pez cebra transparente *absolute* permite la realización y el seguimiento de ensayos *in vivo*.
3. El desarrollo e implantación de la cría artificial en el laboratorio permitiría la producción a gran escala de peces *absolute* y la mejora de la calidad y viabilidad de las puestas.
4. La administración de *Ovopel Hungary* en el pez cebra para la inducción hormonal reproductiva es segura biológicamente.
5. La administración de *Ovopel Hungary* parece potenciar la hormonación reproductiva del pez cebra. Se requiere la realización de más ensayos largos con un tamaño muestral mayor para su confirmación.

7. Limitaciones

La principal limitación del desarrollo de la cría artificial fue el tiempo. La implantación de un procedimiento en laboratorio es costosa y requiere meses de trabajo hasta obtener resultados óptimos. Por ello, en este proyecto no se pudo completar el diagrama de experimentación para la cría artificial (ver apartado 3.7 *Cría artificial: Diagrama teórico*).

Para aumentar la potencia, la fiabilidad y la reproducibilidad de los resultados, los experimentos de cría artificial requerirían un tamaño muestral mayor.

Para confirmar el efecto de la hormona *Ovopel* en la línea *absolute*, se deberían de replicar los experimentos en ejemplares de este fenotipo. Sin embargo, debido al elevado coste de esta línea, los experimentos de cría artificial se realizaron en ejemplares de fenotipo *wild-type*.

Una vez optimizado el uso de un fármaco, se debe de comparar su efectividad frente a otros compuestos, teniendo en cuenta un tamaño muestral mayor. El análisis estadístico de los resultados obtenidos determinará la mejor alternativa para poder implantar definitivamente la cría artificial como un procedimiento eficaz, seguro y reproducible en el laboratorio.

8. Bibliografía

1. Henrique Franco N. Animal experiments in biomedical research: A historical perspective. *Animals*. 2013;3(1):238–73.
2. Tannenbaum J, Bennett BT. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *J Am Assoc Lab Anim Sci* [Internet]. 2015;54(2):120–32.
3. Fentener van Vlissingen J, Borrens M, Girod A, Lelovas P, Morrison F, Torres YS. The reporting of clinical signs in laboratory animals. *Lab Anim* [Internet]. 2015;49(4):267–83.
4. Romero-Fernandez W, Batista-Castro Z, De Lucca M, Ruano A, García-Barceló M, Rivera-Cervantes M, et al. El 1, 2, 3 de la experimentación con animales de laboratorio. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2016;33(2):288–99.
5. Avey MT, Fenwick N, Griffin G. The use of systematic reviews and reporting guidelines to advance the implementation of the 3Rs. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2015;54(2):153–62.
6. Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2007;8(5):353–67.
7. Nasiadka A, Clark MD. Zebrafish Breeding in the Laboratory Environment. *ILAR J*. 2012;53(2):161–8.
8. Chakraborty C, Hsu CH, Wen ZH, Lin CS, Agoramorthy G. Zebrafish: a complete animal model for in vivo drug discovery and development. *Curr Drug Metab* [Internet]. 2009;10(2):116–24.
9. Aleström P, Holter JL, Nourizadeh-Lillabadi R. Zebrafish in functional genomics and aquatic biomedicine. *Trends Biotechnol*. 2006;24(1):15–21.
10. Howe K, Clark M, Torroja C, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* [Internet]. 2013;496(7446):498–503.
11. Baxendale S, van Eeden F, Wilkinson R. The Power of Zebrafish in personalised medicine. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2017.
12. Howe DG, Bradford YM, Eagle A, Fashena D, Frazer K, Kalita P, et al. The Zebrafish Model Organism Database: New support for human disease models, mutation details, gene expression phenotypes and searching. *Nucleic Acids Res*. 2017;
13. Bradford YM, Toro S, Ramachandran S, Ruzicka L, Howe DG, Eagle A, et al. Zebrafish models of human disease: Gaining insight into human disease at ZFIN. *ILAR J*. 2017;

14. White RM, Sessa A, Burke C, Bowman T, LeBlanc J, Ceol C, et al. Transparent Adult Zebrafish as a Tool for In Vivo Transplantation Analysis. *Cell Stem Cell*. 2008;2(2):183–9.
15. Singh AP, Nüsslein-Volhard C. Zebrafish stripes as a model for vertebrate colour pattern formation. *Curr Biol*. 2015;25(2):R81–92.
16. Rawls JF, Mellgren EM, Johnson SL. How the Zebrafish Gets Its Stripes. *Dev Biol [Internet]*. 2001;240(2):301–14.
17. Lister J, Robertson C, Lepage T, Johnson S, Raible D. Nacre Encodes a Zebrafish Microphthalmia-Related Protein That Regulates Neural-Crest-Derived Pigment Cell Fate. *Development [Internet]*. 1999;126(17):3757–67.
18. Kurtzman MS, Craig MP, Grizzle BK, Hove JR. Sexually segregated housing results in improved early larval survival in zebrafish. *Lab Anim (NY) [Internet]*. 2010;39(6):183–9.
19. Van den Hurk R, Lambert JGD. Ovarian steroid glucuronides function as sex pheromones for male zebrafish *Brachydanio rerio*. *Can J Zool*. 1983;61:2381–6.
20. Herraéz-Baranda, L., Rodríguez, J.F., Felipe, A., San Segundo L. y Guinea J. Biological and technological advances for ecotoxicity and human health risk assessment using zebrafish embryos. In Poster presented at the 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences.; 2005.
21. Bradbury J. Small fish, big science. *PLoS Biol*. 2004;2(5):568–72.
22. Mikolajczyk T, Chyb J, Szczerbik P, Sokolowska-Mikolajczyk M, Epler P, Enright WJ, et al. Evaluation of the potency of azagly-nafarelin (GnRH analogue), administered in combination with different formulations of pimozide, on LH secretion, ovulation and egg quality in common carp (*Cyprinus carpio* L.) under laboratory, commercial hatchery and na. *Aquaculture*. 2004;234(1–4):447–60.
23. Szabó T, Medgyasszay C, Horváth L. Ovulation induction in nase (*Chondrostoma nasus*, Cyprinidae) using pituitary extract or GnRH analogue combined with domperidone. *Aquaculture*. 2002;203(3–4):389–95.
24. Kouřil J, Svoboda M, Hamáčková J, Kaláb P, Kolářová J, Leplčová A, et al. Repeated administration of different hormonal preparations for artificial propagation and their effects on reproduction, survival and blood biochemistry profiles of female tench (*Tinca tinca* L.). *Czech J Anim Sci*. 2007;52(6):183–8.
25. Il JK, Barth T, Hamackova J, Flegel M. INDUCED OVULATION IN TENCH (*TINCA TINCA* L.) BY VARIOUS LH-RH SYNTHETIC ANALOGUES: EFFECT OF SITE OF ADMINISTRATION AND TEMPERATURE of the effect of exogenously administered hypothalamic peptide factor with releasing activity for gonadotropins. *Differences*. 1986;54:37–44.

26. Mikolajczyk T, Chyb J, Sokolowska-Mikolajczyk M, Enright WJ, Epler P, Filipiak M, et al. Attempts to induce an LH surge and ovulation in common carp (*Cyprinus carpio* L.) by differential application of a potent GnRH analogue, azagly-nafarelin, under laboratory, commercial hatchery, and natural conditions. *Aquaculture*. 2003;223(1–4):141–57.
27. Podhorec P, Kouril J. Induction of final oocyte maturation in Cyprinidae fish by hypothalamic factors: A review. *Vet Med (Praha)*. 2009;54(3):97–110.
28. Popesku JT, Martyniuk CJ, Mennigen J, Xiong H, Zhang D, Xia X, et al. The goldfish (*Carassius auratus*) as a model for neuroendocrine signaling. *Mol Cell Endocrinol*. 2008;293(1–2):43–56.
29. Reed B, Jennings M. Guidance on the housing and care of Zebrafish *Danio rerio*. Res Anim Dep Sci Group, RSPCA. 2011;1–27.
30. Carter KM, Woodley CM, Brown RS. A review of tricaine methanesulfonate for anesthesia of fish. *Rev Fish Biol Fish*. 2011;21(1):51–9.
31. Eaton RC, Farley RD. Spawning Cycle and Egg Production of Zebrafish, *Brachydanio rerio*, in the Laboratory. *Copeia*. 1974;1(1):195–204.
32. Brand, M., Granato, M. & Nüsslein-Volhard C. Keeping and raising zebrafish. Oxford University Press, Oxford, UK.; 2002.
33. Horvath, L.; Szabo, T.; Burke J. Hatchery testing of GnRH analogue-containing pellets on ovulation in four cyprinid species. *olskie Arch Hydrobiol*. 1997;44(1-2):221–6.
34. Brzuska E. Artificial spawning of female Polish line 3 carp (*Cyprinus carpio* L.) after treatment with pituitary homogenate and/or Ovopel. *Aquac Res*. 2003;34(14):1321–7.
35. Brzuska E. Artificial spawning of European catfish *Silurus glanis* L.: Differences between propagation results after stimulation of ovulation with carp pituitary and Ovopel. *Aquac Res*. 2001;32(1):11–9.
36. Targońska K, Kucharczyk D. The Application of hCG, CPH and Ovopel in Successful Artificial Reproduction of Goldfish (*Carassius auratus auratus*) Under Controlled Conditions. *Reprod Domest Anim*. 2011;46(4):651–5.
37. Maruska KP, Fernald RD. Social Regulation of Gene Expression in the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis. *Physiology* [Internet]. 2011;26(6):412–23.

9. Anexo**TRAZABILIDAD CRUCES PEZ CEBRA****Danio rerio****Puesta natural****Fenotipo: *Absolute***

Fecha	N° Peceras	N° Peces (♂/♀)	Éxito Cruce/Pecera	N° Huevos Totales	Viabilidad 24 h (%)
14/09/2017	2	6/4	0/2	0	0
15/09/2017	2	4/3	1/2	90	30
25/09/2017	6	18/12	3/6	450	35
26/09/2017	2	6/4	1/2	80	25
27/09/2017	3	9/6	2/3	250	15
28/09/2017	4	12/8	2/4	130	40
29/09/2017	2	3/7	1/2	150	30
04/10/2017	2	6/4	0/2	0	0
05/10/2017	1	2/3	1/1	50	50
06/10/2017	5	13/9	4/5	1000	65
10/10/2017	3	7/6	0/3	0	0
11/10/2017	2	6/4	1/2	100	29
16/10/2017	4	3/2	3/4	850	29
17/10/2017	2	5/4	1/2	250	55
18/10/2017	3	7/6	1/3	250	15
19/10/2017	2	3/2	2/2	629	80
20/10/2017	2	3/2	1/2	200	56
23/10/2017	2	6/3	1/2	185	30
24/10/2017	3	3/2	2/3	565	60
25/10/2017	3	3/2	3/3	950	55
26/10/2017	7	3/2	0/7	0	0
27/10/2017	2	3/2	1/2	100	70
30/06/2017	8	3/2	6/8	800	70
06/11/2017	4	12/8	1/4	100	50
07/11/2017	5	15/6	0/5	0	0
08/11/2017	7	21/14	4/7	480	65
15/11/2017	4	12/8	0/4	0	0

Fenotipo: Wild-type

Fecha	Nº Peceras	Nº Peces (♂/♀)	Éxito Cruce/Pecera	Nº Huevos Totales	Viabilidad 24 h (%)
14/09/2017	3	9/7	2/3	175	80
15/09/2017	3	8/6	2/3	165	75
20/09/2017	8	24/17	1/8	130	80
21/09/2017	8	24/17	5/8	665	70
26/09/2017	2	6/4	1/2	20	50
27/09/2017	2	6/4	1/2	0	0
02/10/2017	2	5/4	2/2	150	0
03/10/2017	9	25/18	0/9	0	0
04/10/2017	5	14/9	3/5	800	66
05/10/2017	6	17/11	0/6	0	20
09/10/2017	4	9/8	3/4	500	55
10/10/2017	4	9/8	2/4	190	82
11/10/2017	5	8/10	2/5	170	29
13/10/2017	7	21/14	1/7	130	46
16/10/2017	3	9/6	2/3	650	12
17/10/2017	5	15/10	2/5	150	30
18/10/2017	5	15/10	2/5	350	65
19/10/2017	5	15/10	2/5	150	65
20/10/2017	5	15/10	3/5	550	20
23/10/2017	5	15/10	0/5	0	0
24/10/2017	4	12/8	1/4	48	100
25/10/2017	4	12/8	2/4	346	75
26/10/2017	7	12/8	3/7	890	70
27/10/2017	4	12/12	1/4	150	60
31/10/2017	7	21/14	7/7	700	70
03/11/2017	9	27/18	2/9	150	40
06/11/2017	1	3/2	1/1	550	80
07/11/2017	5	15/10	3/5	500	80
08/11/2017	3	9/6	3/3	500	75
09/11/2017	8	24/16	6/8	1130	60
13/11/2017	7	21/14	3/7	480	65
14/11/2017	5	15/10	3/5	422	67
15/11/2017	3	9/6	1/3	490	40
16/11/2017	4	12/8	2/4	500	60
17/11/2017	3	9/6	3/3	120	70
20/11/2017	7	21/14	6/7	825	25
21/11/2017	7	21/14	3/7	130	90
22/11/2017	7	21/14	1/7	450	10
23/11/2017	7	21/14	3/7	750	40
24/11/2017	7	21/14	3/7	120	20
28/11/2017	7	21/14	5/7	750	50

29/11/2017	8	24/16	6/8	1400	40
30/11/2017	7	21/14	5/7	750	50
01/12/2017	7	21/14	4/7	600	20
11/12/2017	8	24/16	6/8	1170	64
12/12/2017	8	24/16	8/8	2450	70
13/12/2017	8	24/16	8/8	1800	80
14/12/2017	8	24/16	6/8	1100	60

REPRODUCCIÓN ASISTIDA PEZ CEBRA

Danio rerio

Registro de Ensayos Inducción Hormonal

Fenotipo: *Wild-type*

Fecha:15/11/2017 **Hormona:** *Ovopel Hungary*

Inyección intraperitoneal (20 µl) | Disolución: 1 *Ovopel* + 1 ml Solución Salina |

Machos				Hembras							
Hora de la inyección				Hora de la inyección							
♂1 :	13:10	♂2 :	13:10	♀1 :	13:15	♀2 :	13:20				
Extracción de esperma				Extracción de óvulos							
♂1 :	-	Muerte	♂2 :	-	Muerte	♀1 :	-	Muerte	♀2 :	-	Muerte

Fecha:15/11/2017 **Hormona:** *Ovopel Hungary*

Inyección intraperitoneal (20 µl) | Disolución: 1 *Ovopel* + 1.25 ml Solución Salina

Machos				Hembras							
Hora de la inyección				Hora de la inyección							
♂1 :	13:10	♂2 :	13:10	♀1 :	13:24	♀2 :	13:28				
Extracción de esperma				Extracción de óvulos							
♂1 :	-	Muerte	♂2 :	-	Muerte	♀1 :	22h	Huevos	♀2 :	-	Muerte

Fecha:22/11/2017 **Hormona:** *Ovopel Hungary*

Inyección intraperitoneal (20 µl) | Disolución: 1 *Ovopel* + 1.5 ml Solución Salina

Machos				Hembras			
Hora de la inyección				Hora de la inyección			
♂1 :	10:59	♂2 :	11:05	♀1 :	11:09	♀2 :	11:11
Extracción de esperma				Extracción de óvulos			
♂1 :	-	Muerte	♂2 :	-	Muerte	♀1 :	22h Huevos
				♀2 :	-	Muerte	

Fecha:22/11/2017 **Hormona:** *Ovopel Hungary*

Inyección intraperitoneal (20 µl) | Disolución: 1 *Ovopel* + 1.75 ml Solución Salina

Machos				Hembras			
Hora de la inyección				Hora de la inyección			
♂1 :	11:20	♂2 :	11:22	♀1 :	11:30	♀2 :	11:36
Extracción de esperma				Extracción de óvulos			
♂1 :	-	Muerte	♂2 :	-	Muerte	♀1 :	22h Huevos
				♀2 :	22h	ØHuevos	

Fecha:23/11/2017 **Hormona:** *Ovopel Hungary*

Inyección intraperitoneal (20 µl) | Disolución: 1 *Ovopel* + 2 ml Solución Salina

Machos				Hembras			
Hora de la inyección				Hora de la inyección			
♂1 :	10:16	♂2 :	10:16	♀1 :	10:12	♀2 :	10:14
Extracción de esperma				Extracción de óvulos			
♂1 :	-	Muerte	♂2 :	-	Muerte	♀1 :	- Muerte
				♀2 :	-	Muerte	

Fecha:23/11/2017 **Hormona:** *Ovopel Hungary*

Inyección intraperitoneal (20 µl) | Disolución: 1 *Ovopel* + 2.25 ml Solución Salina

Machos				Hembras			
Hora de la inyección				Hora de la inyección			
♂1 :	11:20	♂2 :	11:22	♀1 :	11:30	♀2 :	11:36
Extracción de esperma				Extracción de óvulos			
♂1 :	-	Muerte	♂2 :	-	Muerte	♀1 :	-
				♀2 :	-	Muerte	

Fecha:28/11/2017 **Hormona:** *Ovopel Hungary*

Inyección intraperitoneal (20 µl) | Disolución: 1 *Ovopel* + 2.5 ml Solución Salina

Machos				Hembras			
Hora de la inyección				Hora de la inyección			
♂1 :	11:35	♂2 :	11:35	♀1 :	11:26	♀2 :	11:30
Extracción de esperma				Extracción de óvulos			
♂1 :	11:50	Eutanasia	♂2 :	-	Muerte	♀1 :	-
				♀2 :	-	Muerte	

Fecha:28/11/2017 **Hormona:** *Ovopel Hungary*

Inyección intraperitoneal (20 µl) | Disolución: 1 *Ovopel* + 2.75 ml Solución Salina

Machos				Hembras			
Hora de la inyección				Hora de la inyección			
♂1 :	11:20	♂2 :	11:22	♀1 :	11:30	♀2 :	11:36
Extracción de esperma				Extracción de óvulos			
♂1 :	-	Muerte	♂2 :	-	Muerte	♀1 :	-
				♀2 :	-	Muerte	

Fecha:29/11/2017 **Hormona:** *Ovopel Hungary*

Inyección intraperitoneal (20 µl) | Disolución: 1 *Ovopel* + 3 ml Solución Salina

Machos				Hembras							
Hora de la inyección				Hora de la inyección							
♂1 :	10:10	15:10	♂2 :	10:11	15:11	♀1 :	10:05 15:05	♀2 :	10:08 15:08		
Extracción de esperma				Extracción de óvulos							
♂1 :	24h ~esperma		♂2 :	24h ~esperma		♀1 :	24h Huevos (nv)		♀2 :	24h Huevos (nv)	

Fecha:29/11/2017 **Hormona:** *Ovopel Hungary*

Inyección intraperitoneal (20 µl) | Disolución: 1 *Ovopel* + 3.25 ml Solución Salina

Machos				Hembras						
Hora de la inyección				Hora de la inyección						
♂1 :	10:40	15:40	♂2 :	10:40	15:40	♀1 :	10:35 15:35	♀2 :	10:39 15:39	
Extracción de esperma				Extracción de óvulos						
♂1 :	24h ~esperma		♂2 :	24h ~esperma		♀1 :	24h Huevos (nv)		♀2 :	- Muerte

Fecha:30/11/2017 **Hormona:** *Ovopel Hungary*

Inyección intraperitoneal (20 µl) | Disolución: 1 *Ovopel* + 3.5 ml Solución Salina

Machos				Hembras							
Hora de la inyección				Hora de la inyección							
♂1 :	10:25	15:25	♂2 :	10:40	15:40	♀1 :	10:10 15:40	♀2 :	10:16 15:46		
Extracción de esperma				Extracción de óvulos							
♂1 :	-	Muerte	♂2 :	-	Muerte	♀1 :	22h Huevos (nv)		♀2 :	22h Huevos (nv)	

Fecha:30/11/2017 **Hormona:** *Ovopel Hungary*

Inyección intraperitoneal (20 µl) | Disolución: 1 *Ovopel* + 3.75 ml Solución Salina

Machos				Hembras							
Hora de la inyección				Hora de la inyección							
♂1 :	10:45	15:45	♂2 :	10:40	15:40	♀1 :	10:50	15:50	♀2 :	11:00	16:00
Extracción de esperma				Extracción de óvulos							
♂1 :	-	Muerte	♂2 :	24h	Øesperma	♀1 :	22h	Huevos (nv)	♀2 :	22h	Huevos (nv)

Fecha:12/12/2017 **Hormona:** *Ovopel Hungary*

Inyección intraperitoneal (20 µl) | Disolución: 1 *Ovopel* + 4 ml Solución Salina

Machos				Hembras							
Hora de la inyección				Hora de la inyección							
♂1 :	9:45	15:45	♂2 :	9:45	15:45	♀1 :	9:55	15:55	♀2 :	9:57	15:47
Extracción de esperma				Extracción de óvulos							
♂1 :	24h	~esperma	♂2 :	-	Muerte	♀1 :	24h	Ø Huevos	♀2 :	24h	Huevos (nv)

Fecha:12/12/2017 **Hormona:** *Ovopel Hungary*

Inyección intraperitoneal (20 µl) | Disolución: 1 *Ovopel* + 4.25 ml Solución Salina

Machos				Hembras							
Hora de la inyección				Hora de la inyección							
♂1 :	10:00	15:15	♂2 :	10:00	15:15	♀1 :	10:05	15:20	♀2 :	10:30	15:30
Extracción de esperma				Extracción de óvulos							
♂1 :	24h	~esperma	♂2 :	24h	~esperma	♀1 :	24h	Huevos (nv)	♀2 :	24h	Huevos (nv)

Fecha:19/12/2017 **Hormona:** *Ovopel Hungary*

Inyección intraperitoneal (20 µl) | Disolución: 1 *Ovopel* + 4 ml Solución Salina

Machos				Hembras									
Hora de la inyección				Hora de la inyección									
♂1 :	10:24	15:24	♂2 :	10:26	15:26	♀1 :	10:19	15:19	♀2 :	10:23	15:23		
Extracción de esperma				Extracción de óvulos									
♂1 :	Muerte por pinchazo			♂2 :	23h ~esperma			♀1 :	23h Ø Huevos		♀2 :	23h Ø Huevos	

Fecha:19/12/2017 **Hormona:** *Ovopel Hungary*

Inyección intraperitoneal (20 µl) | Disolución: 1 *Ovopel* + 4.25 ml Solución Salina

Machos				Hembras									
Hora de la inyección				Hora de la inyección									
♂1 :	10:35	16:35	♂2 :	10:36	15:36	♀1 :	10:40	15:40	♀2 :	10:43	15:43		
Extracción de esperma				Extracción de óvulos									
♂1 :	23h ~esperma			♂2 :	23h ~esperma			♀1 :	23h Huevos (nv)		♀2 :	23h Huevos (nv)	

Fecha:20/12/2017 **Hormona:** *Ovopel Hungary*

Inyección intraperitoneal (20 µl) | Disolución: 1 *Ovopel* + 4 ml Solución Salina

Machos				Hembras									
Hora de la inyección				Hora de la inyección									
♂1 :	10:19	15:19	♂2 :	10:20	15:20	♀1 :	10:30	15:30	♀2 :	10:33	15:33		
Extracción de esperma				Extracción de óvulos									
♂1 :	24h Ø esperma			♂2 :	24h ~esperma			♀1 :	24h Ø Huevos		♀2 :	24h Huevos (nv)	

Fecha:20/12/2017 **Hormona:** *Ovopel Hungary*

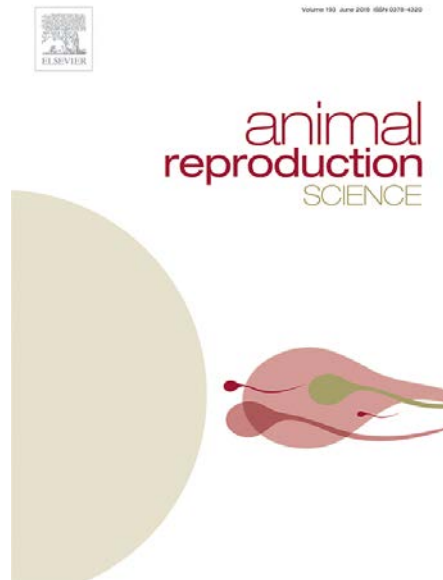
Inyección intraperitoneal (20 µl) | Disolución: 1 *Ovopel* + 4 ml Solución Salina

Machos				Hembras							
Hora de la inyección				Hora de la inyección							
♂1 :	10:25	15:25	♂2 :	10:26	15:26	♀1 :	10:40	15:40	♀2 :	10:45	15:45
Extracción de esperma				Extracción de óvulos							
♂1 :	24h Ø esperma		♂2 :	24h ~esperma		♀1 :	24h Ø Huevos		♀2 :	24h Ø Huevos	

10. Borrador de Artículo

**Comparación de la cría natural vs reproducción
inducida hormonalmente para la producción a gran
escala de peces cebra *absolute***

Revista seleccionada: *Animal Reproduction Science*



Autores: S. Palomino*, M. Barajas, I. Lamberto

Facultad de Ciencias de la Salud,
Universidad Pública de Navarra, Pamplona, España

*Autor para correspondencia: spalomino@alumni.unav.es

RESUMEN

En los últimos años el pez cebra (*Danio rerio*) se ha establecido como una especie en auge en la investigación científica. Su similitud genética y molecular con la de los humanos, lo convierten en un modelo versátil en el ámbito biomédico, la toxicogenómica y la ecotoxicidad.

Procedimientos de ingeniería genética han conseguido silenciar los genes encargados de la pigmentación de la piel del pez cebra originando un fenotipo transparente. Gracias a ello, es posible realizar ensayos que permiten detectar cambios a nivel morfológico y fenotípico sin sacrificio, debido a la posibilidad de hacer un seguimiento visual.

Sin embargo, el coste de peces de fenotipo transparente es muy elevado. Una solución a este problema sería la optimización de la reproducción artificial y cría asistida del pez cebra, para así obtener tantos embriones del fenotipo deseado como se necesite.

Para ello, es necesario analizar la vía hormonal reproductiva del pez con el fin de encontrar fármacos que la potencien, y desarrollar un protocolo de cría inducida hormonalmente para su implantación en el laboratorio.

PALABRAS CLAVE

Pez cebra, *Danio rerio*, fenotipo *absolute*, inducción hormonal reproductiva, *Ovopel*.

INTRODUCCIÓN

El pez de agua dulce conocido como pez cebra (*Danio rerio*), pertenece a una familia de peces teleósteos fisóstomos: los ciprínidos o carpas (*Cyprinidae*) (1).

Una comparación directa entre los genes codificantes de humanos y del pez cebra revela un aspecto muy relevante: el 71,4% de los genes humanos poseen al menos un ortólogo en el pez cebra. Por ello, a pesar de las diferencias obvias entre la fisiología de los humanos y de los peces, *Danio rerio* se trata de un modelo eficaz para la investigación biomédica y la medicina personalizada (2).

Otras características que convierten al pez cebra en un excelente modelo de experimentación, son la transparencia óptica de los embriones y el desarrollo tardío de la respuesta inmunitaria adaptativa (4-6 semanas post-fecundación).

Sin embargo, la investigación se veía acotada al estadio larvario del pez. Para combatir esta limitación, procedimientos de ingeniería genética, han conseguido silenciar con éxito los genes encargados de la pigmentación de la piel de *Danio rerio*, de modo que el pez también es transparente en estado adulto (3,4).

La línea mutante de pez cebra conocida como *absolute* permite la visualización del corazón, la aorta, el tubo intestinal, el hígado, la vesícula biliar, e incluso áreas cerebrales. Adicionalmente, es posible observar la presencia de huevos en hembras adultas (4). El mutante *absolute* ha demostrado ser totalmente viable, además de producir una descendencia normal.

De este modo el abanico de ensayos disponibles en el pez cebra se hace más grande: es posible realizar ensayos con fármacos, células cancerosas y células madre sin que el organismo lo detecte como extraño, además de detectar cambios tanto a nivel morfológico como fenotípico sin sacrificio debido a que se puede hacer un seguimiento visual.

La principal desventaja es que el coste económico de una pareja de peces adultos de fenotipo *absolute*, frente a una pareja de fenotipo *wild-type* es 10 veces superior. Una posible solución sería el análisis del ciclo reproductor y de la cría natural del pez cebra con el fin de elaborar un protocolo estandarizado de inducción hormonal reproductiva para la producción a gran escala de peces *absolute* en el laboratorio.

Una estrategia basada en terapias de inducción hormonal reproductiva en ciprínidos como *Danio rerio*, podría contemplar el uso de antagonistas de la dopamina (5-7).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El posible desarrollo e implantación de la cría artificial en el laboratorio de peces cebra, garantizaría la eficacia en la obtención de embriones y el mantenimiento de las múltiples puestas, además de reducir costes en la obtención a gran escala de peces de fenotipo *absolute*. Para el desarrollo de la hipótesis se establecieron los siguientes objetivos:

- Analizar y evaluar la calidad y supervivencia de las puestas en la cría natural de peces cebra (*absolute* y *wild-type*).
- Estudiar la vía hormonal reproductiva del pez cebra y buscar fármacos agonistas y antagonistas que la potencien.
- Desarrollar e implantar un protocolo estandarizado de cría artificial inducida hormonalmente.

MÉTODOS

ANIMALES

Se emplearon peces adultos maduros sexualmente de edades comprendidas entre 3-6 meses, con un peso aproximado de 300 ± 25 mg y una longitud de 3 ± 0.5 cm.

Para los procedimientos de cría natural se emplearon peces tanto del fenotipo *wild-type* como del *absolute*. Para los procedimientos de cría artificial se emplearon peces cebra *wild-type* como donantes de ovocitos y esperma.

CRÍA NATURAL

La viabilidad y reproducción del pez cebra está muy influenciada por factores como el tipo de alimentación, la higiene, el estrés, y la iluminación. La calidad de la puesta dependerá por tanto de dichas condiciones.

La preparación de los tanques de cría tiene lugar el día anterior a la puesta. Para ello se seleccionan los machos ($n=2/3$) y las hembras ($n=2$) y se mantienen en tanques a $\sim 28^\circ\text{C}$ separados por sexos mediante una barrera. La estimulación a la cría se da con el comienzo de luz y el levantamiento de la barrera.

Durante el cortejo el macho persigue a la hembra y le golpea la zona ventral con la parte caudal. Como consecuencia la hembra libera los cientos de huevos que alberga estimulando al macho a expulsar los espermatozoides que fecundan a los huevos.

Tras el apareamiento (~2h), se detecta la presencia de huevos ya fecundados en el fondo del tanque, y se devuelven machos y hembras a su pecera de origen. La recogida de los huevos tiene lugar mediante el uso de un colador con el que se filtra el agua de los tanques de apareamiento.

Los huevos fertilizados se conservan en placas Petri en una incubadora a 28°C cubiertos con solución E3 + metileno.

CRÍA ARTIFICIAL

La elección de los posibles fármacos para inducir la estimulación hormonal reproductiva para la cría artificial de los peces cebra, se realizó mediante el análisis bibliográfico de compuestos agonistas y antagonistas que potenciasen la vía hormonal del pez. El compuesto elegido fue la hormona *Ovopel Hungary*, un agente cuyos principios activos son un oligopéptido análogo a la Gonadotropina y el antagonista dopaminérgico Metaclopramida.

Previamente a la realización de los experimentos de cría artificial, se definió un diagrama teórico que recoge los conceptos clave para la validez interna de los procedimientos. Se basó en las pautas del Asistente de diseño experimental del Centro Nacional de las 3Rs de Reino Unido (<https://eda.nc3rs.org.uk/>) (Fig. 1)

La selección aleatoria de los peces a tratar tiene lugar el día anterior al procedimiento. Los machos y hembras son separados en peceras diferentes, y se mantienen en ayuno hasta que finalice el ensayo. La preparación de la solución hormonal tiene lugar inmediatamente antes de inyectarla para evitar que precipite.

El modo de anestesiar al pez, fue mediante la sumersión del mismo en triclaína diluida en agua destilada. Una vez anestesiado y tras la esterilización se inyecta en la zona intraperitoneal 20 µl de la solución hormonal.

Entre 22 y 24 horas tras la administración del fármaco, se procede a la extracción del esperma de los peces macho. Para ello, es muy importante evitar contaminaciones de orina, heces o mucus secado suavemente la zona abdominal con una servilleta de papel. A continuación, se realiza un masaje abdominal mientras que se succiona el área urogenital con una pipeta *pasteur* (1 ml).

El semen obtenido se diluye en 500 μ l de *Han's stock #1 solution* (http://cshprotocols.cshlp.org/content/2007/8/pdb.rec11072.full?text_only=true). Desde su extracción, hasta su utilización (tiempo máximo de 3 h), esta solución se debe mantener en condiciones adecuadas de oxigenación y temperatura (4°C).

Entre 22 y 24 horas tras la administración del fármaco, los peces hembra presentan el abdomen abultado indicando la presencia de huevos. Para su extracción, se procede al anestesiado de las hembras del mismo modo que detalla el apartado anterior. Los huevos son expulsados fácilmente mediante la presión abdominal del pez. Inmediatamente después se recogen en una placa Petri limpia y seca, y se recubren con la solución que contiene el esperma. A continuación, se cubren los huevos con solución E3 + metileno evitando movimientos bruscos. Los huevos se activan por contacto con el agua y son fecundados por la acción del esperma. La fertilización de los huevos tiene lugar de forma muy rápida, entre 20 y 60 segundos. La placa se conserva en la incubadora a $28,5 \pm 1$ °C.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La comparación de la calidad de las puestas por cría natural entre los fenotipos *wild-type* y *absolute* se analizó con el Test de Wilcoxon para dos muestras independientes. La supervivencia por sexo tras la administración de *Ovopel* se analizó mediante el test para la diferencia de proporciones. La proporción de peces vivos (total de machos y hembras) frente a la dilución de la hormona se ajustó mediante una curva de regresión logística. Se consideraron significativos aquellos valores con una $p < 0.05$.

RESULTADOS

CRÍA NATURAL

Para evaluar el éxito de la cría natural en *Danio rerio*, se analizaron las puestas de los peces tanto de fenotipo *wild-type* como *absolute* del último trimestre del 2017. Para ello, se calculó la viabilidad de los huevos fecundados mediante el cociente de los huevos viables a las 24 hpf entre el total de ovocitos que fueron fecundados inicialmente, para cada uno de los grupos.

Durante el último trimestre de 2017, hubo un total de 27 puestas del fenotipo *absolute* con una tasa de viabilidad media del 40,74 % (Fig. 2)

Durante el último trimestre de 2017, hubo un total de 48 puestas del fenotipo *wild-type* con tasa de viabilidad media del 62,5 % (Fig. 3)

Los datos referentes a las puestas por cría natural, revelaron que la tasa de viabilidad de los huevos del fenotipo *wild-type* frente al fenotipo *absolute* (IC 95%) es significativamente mayor ($p < 0,05$). (Test de Wilcoxon para dos muestras independientes).

CRÍA ARTIFICIAL

Para analizar los efectos de la inducción hormonal reproductiva en *Danio rerio*, se procedió a la administración y evaluación del compuesto *Ovopel Hungary* en un total de 72 ejemplares (36 machos y 36 hembras).

Para ello inyectaron 20 μ l a partir de una disolución de 1 pellet de *Ovopel* (50-55 mg) y 1 ml de solución salina (NaCl 0,9%). La muestra se fue diluyendo mediante la adición de solución salina en intervalos de 0,25 ml hasta 4,25 ml (se evaluaron un total de 14 diluciones diferentes de la solución hormonal).

El análisis de la proporción de peces vivos en machos y en hembras por separado (IC 95%) (test para la diferencia de proporciones), reveló que no existían diferencias significativas en la supervivencia entre ambos grupos ($p < 0,05$).

La proporción de peces vivos (total de machos y hembras) frente a la dilución de la hormona se ajustó mediante una curva de regresión logística. Los coeficientes del modelo revelaron la existencia de una interacción estadísticamente significativa en la supervivencia de los peces a medida que aumenta la dilución de *Ovopel* ($p < 0,05$). La curva se ajusta a la fórmula: $\text{logit}[\pi(x)] = \log(\pi(x)/1 - \pi(x)) = -4.611 + 1.592 x$ (Fig. 4)

Tras el ajuste del modelo, se determinó que la barrera de seguridad biológica se encuentra en la disolución formada por 1 pellet de *Ovopel* y 4 ml de solución salina 0.9%)

La **segunda fase** de experimentación consistió en la realización de variaciones en cuanto al número de dosis inyectadas y a las horas de actuación de la hormona hasta obtener huevos y esperma. De acuerdo con la bibliografía y tras varias pruebas, se determinó administrar 2 dosis de *Ovopel*, con un intervalo de 5 horas entre cada dosis.

La presencia de huevos y espermatozoides se comprobó entre 22 y 24 horas después de la inyección de la hormona. De los que ejemplares que sobrevivieron, en el 80% de los machos se logró inducir el proceso de espermiación y en el 65,2% de las hembras se estimuló el proceso de ovulación.

Sin embargo, se requieren más experimentos para ajustar con precisión las horas de actuación del fármaco con el fin de aumentar el número de ejemplares en los que se induce con éxito la hormonación reproductiva.

DISCUSIÓN

CRÍA NATURAL

Un pez cebra hembra es capaz de poner huevos prácticamente a diario, pero si se somete todos los días al proceso de cría, el número y la calidad de los huevos se ve muy afectado. Respecto a los machos, la producción de espermatozoides supone un coste metabólico menor que la ovulación, aunque posiblemente la calidad también se vea afectada si el apareamiento es diario. La evidencia sugiere que la cría de los peces cebra más de una vez cada dos días reduce el número y la viabilidad de las puestas. Por ello es recomendable el descanso de una semana entre ciclos de apareamiento (8,9).

En referencia a la viabilidad, una buena puesta se define como aquella que contiene entre 70 y 200 huevos, de los cuales entorno al 80% son fecundados, alcanzando una proporción aproximada de huevos viables del $70\pm 20\%$. Estos resultados se consiguen cuando las condiciones de bienestar de los animales son óptimas y estos han alcanzado la madurez sexual (10).

En cuanto a los resultados obtenidos en *Cría natural* en el último trimestre de 2017, la tasa de viabilidad media de los huevos de fenotipo *absolute* fue del 40,74 %. Este valor es inferior a la proporción aproximada de huevos viables según la bibliografía ($70\pm 20\%$ SD). La causa más probable de este hecho, es que la edad de los ejemplares *absolute* era 20 meses. Está demostrado que la tasa de fertilidad y la calidad de los gametos en el pez cebra comienza a deteriorarse alrededor de los 12-16 meses de vida; por ello la cría natural en condiciones óptimas va desde los 3-4 meses hasta el año (1).

La tasa de viabilidad media de los huevos de fenotipo *wild-type* fue del 62,5 %, un valor dentro del rango normal de viabilidad ($70\pm 20\%$ SD).

CRÍA ARTIFICIAL

Los experimentos en los que se testó la hormona *Ovopel* se limitaron principalmente a conseguir seguridad biológica, es decir, encontrar la dilución del fármaco que no implicase alteraciones en el comportamiento natural de los peces ni muerte. La evaluación de los resultados reveló la seguridad en la inyección de dos dosis de 20 μ l (con un intervalo de 5 horas entre cada dosis) de la disolución compuesta por 1 pellet de *Ovopel* y 4 ml de solución salina (0,9%).

Los peces que toleraron la dosis administrada, descansaron 3 semanas hasta ser sometidos de nuevo a procesos tanto de cría natural como artificial.

El ajuste con precisión de las horas de actuación del fármaco con el fin de maximizar el número de ejemplares en los que se induce con éxito la hormonación reproductiva, requiere ensayos más largos y con un tamaño muestral mayor.

Una vez optimizado el uso de *Ovopel*, se deberían de realizar ensayos de cría artificial con diferentes hormonas, ver apartado 3.6 *Estudio bibliográfico de fármacos candidatos para la cría artificial*, con el fin de lograr una respuesta en el menor tiempo posible y con la menor cantidad de recursos.

CONCLUSIONES

- El modelo de pez cebra transparente *absolute* permite la realización y el seguimiento de ensayos *in vivo*.
- El desarrollo e implantación de la cría artificial en el laboratorio permitiría la producción a gran escala de peces *absolute* y la mejora de la calidad y viabilidad de las puestas.
- La administración de *Ovopel Hungary* en el pez cebra para la inducción hormonal reproductiva es segura biológicamente.
- La administración de *Ovopel Hungary* parece potenciar la hormonación reproductiva del pez cebra. Se requiere la realización de más ensayos largos con un tamaño muestral mayor para su confirmación.

FIGURAS

Figura 1. Diagrama teórico que recoge los conceptos clave para la validez interna de los procedimientos de cría artificial inducida hormonalmente. Se representan las primeras fases del estudio, las cuales coinciden con las que se llevaron a cabo en este proyecto.

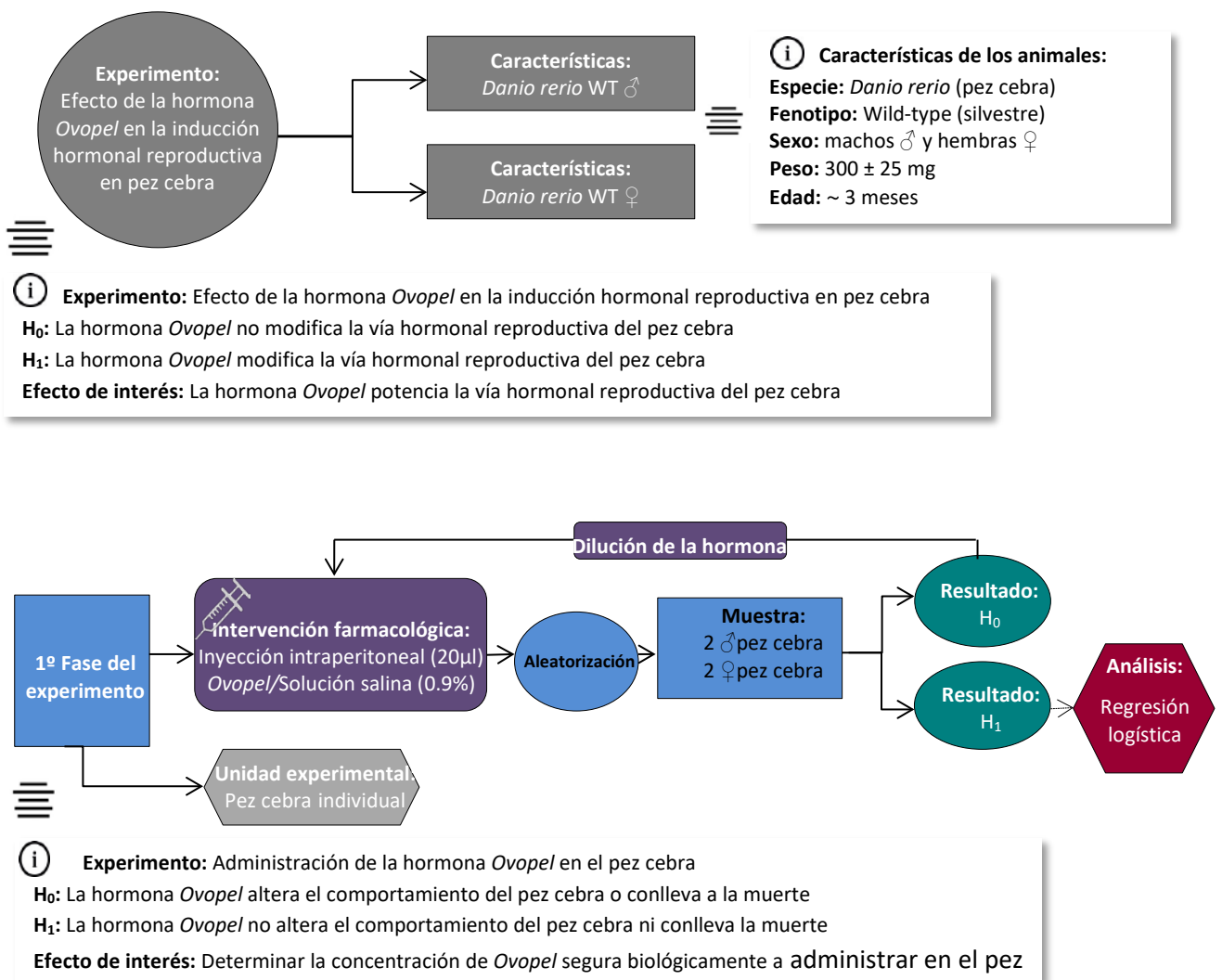


Figura 2. Viabilidad de los huevos de fenotipo *absolute* durante el último trimestre de 2017. Los puntos negros indican el porcentaje de huevos vivos en cada una de las puestas. Las líneas rojas representan los intervalos de viabilidad media de los huevos en condiciones óptimas (entorno al $70\pm 20\%$).

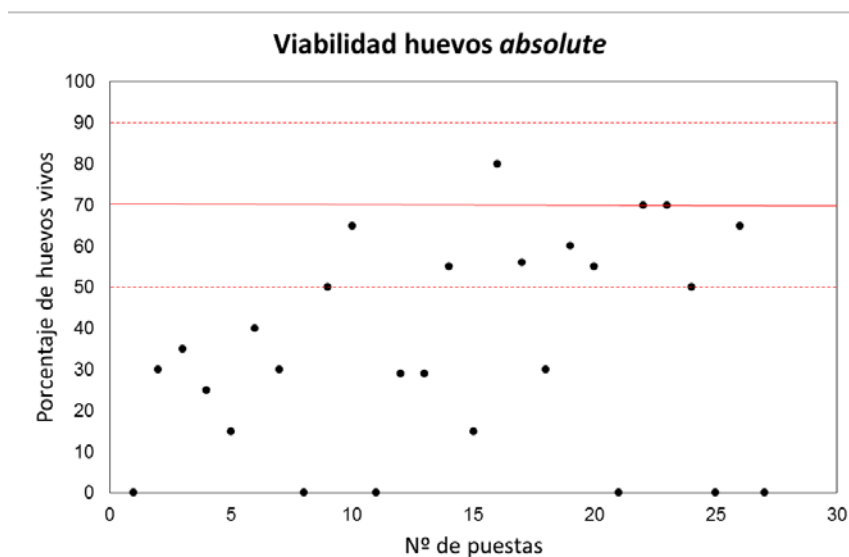


Figura 3. Viabilidad de los huevos de fenotipo *wild-type* durante el último trimestre de 2017. Los puntos negros indican el porcentaje de huevos vivos en cada una de las puestas. Las líneas rojas representan los intervalos de viabilidad media de los huevos en condiciones óptimas (entorno al $70\pm 20\%$).

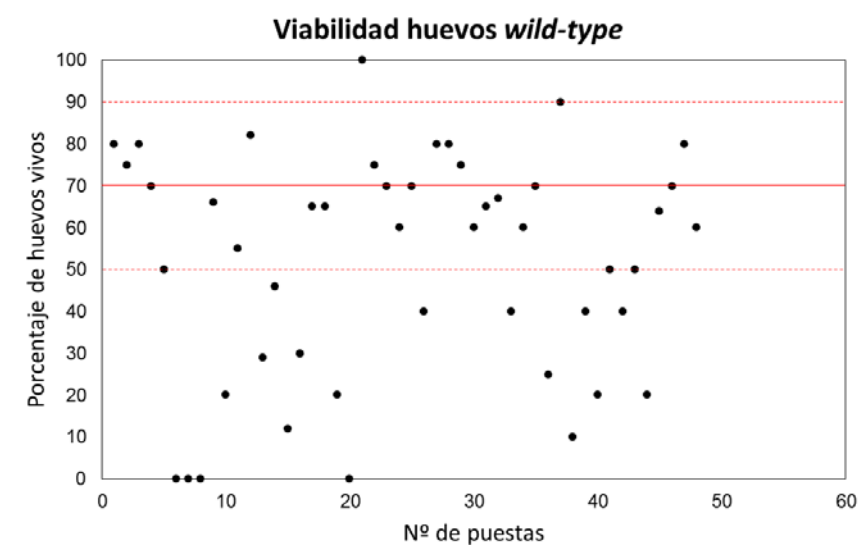
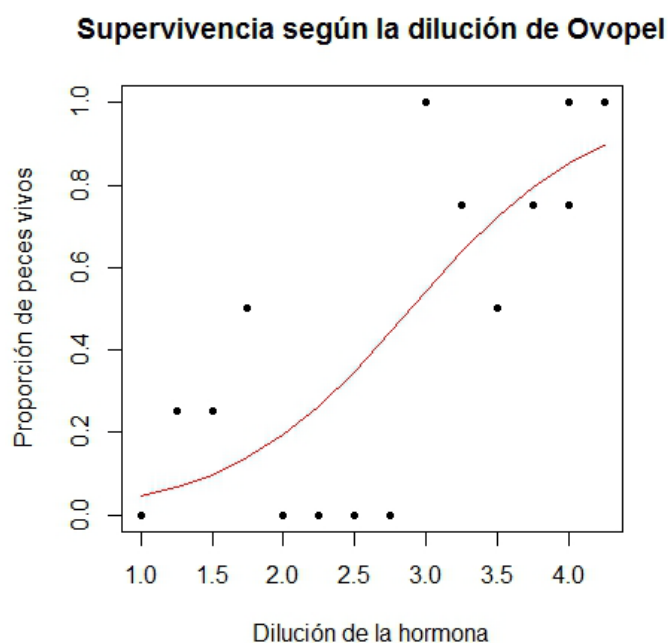


Figura 4. Supervivencia de *Danio rerio* según la dilución administrada de *Ovopel*. Modelo de regresión logística para el ajuste de la proporción de peces vivos frente a la dilución de la hormona.



BIBLIOGRAFÍA

1. Nasiadka A, Clark MD. Zebrafish Breeding in the Laboratory Environment. *ILAR J.* 2012;53(2):161–8.
2. Howe K, Clark M, Torroja C, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* [Internet]. 2013;496(7446):498–503.
3. Lister J, Robertson C, Lepage T, Johnson S, Raible D. Nacre Encodes a Zebrafish Microphthalmia-Related Protein That Regulates Neural-Crest-Derived Pigment Cell Fate. *Development* [Internet]. 1999;126(17):3757–67.
4. White RM, Sessa A, Burke C, Bowman T, LeBlanc J, Ceol C, et al. Transparent Adult Zebrafish as a Tool for In Vivo Transplantation Analysis. *Cell Stem Cell.* 2008;2(2):183–9.

5. Herraéz-Baranda, L., Rodríguez, J.F., Felipe, A., San Segundo L. y Guinea J. Biological and technological advances for ecotoxicity and human health risk assessment using zebrafish embryos. In Poster presented at the 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences.; 2005.
6. Mikolajczyk T, Chyb J, Szczerbik P, Sokolowska-Mikolajczyk M, Epler P, Enright WJ, et al. Evaluation of the potency of azagly-nafarelin (GnRH analogue), administered in combination with different formulations of pimozide, on LH secretion, ovulation and egg quality in common carp (*Cyprinus carpio* L.) under laboratory, commercial hatchery and na. *Aquaculture*. 2004;234(1–4):447–60.
7. Szabó T, Medgyasszay C, Horváth L. Ovulation induction in nase (*Chondrostoma nasus*, Cyprinidae) using pituitary extract or GnRH analogue combined with domperidone. *Aquaculture*. 2002;203(3–4):389–95.
8. Kurtzman MS, Craig MP, Grizzle BK, Hove JR. Sexually segregated housing results in improved early larval survival in zebrafish. *Lab Anim (NY)* [Internet]. 2010;39(6):183–9.
9. Eaton RC, Farley RD. Spawning Cycle and Egg Production of Zebrafish, *Brachydanio rerio*, in the Laboratory. *Copeia*. 1974;1(1):195–204.
10. Brand, M., Granato, M. & Nüsslein-Volhard C. Keeping and raising zebrafish. Oxford University Press, Oxford, UK.; 2002.