

# REDUCIENDO LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL EN TOXICOLOGÍA

El papel clave del embrión de pez cebra

**Monica Torres Ruiz, PhD**

**Centro Nacional de Sanidad Ambiental, ISCIII**

# EL RETO DE REDUCIR LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL



Enfoque global en las 3R: Reemplazo, Reducción y Refinamiento.



Legislaciones como la Directiva 2010/63/UE fomentan métodos alternativos.  
En España RD 53/2013 y RD 1386/2018



Los **embriones de pez cebra (EPC)** <5 días post-fertilización no están clasificados como animales protegidos – Sistema nervioso primitivo que no experimenta dolor.

# EL EPC EN EL MARCO DE LAS 3RS



Reemplazo: Sustituye modelos tradicionales. Modelo con menor potencial al dolor



Reducción: Al utilizar embriones como un primer escalón



Refinamiento: Métodos menos invasivos, mejorando el bienestar animal.

## Identificación de Teratógenos



**Sensitivity** 87.50%

**Specificity** 81.82%

**Accuracy** 74.19%



**Sensitivity** 75.00%

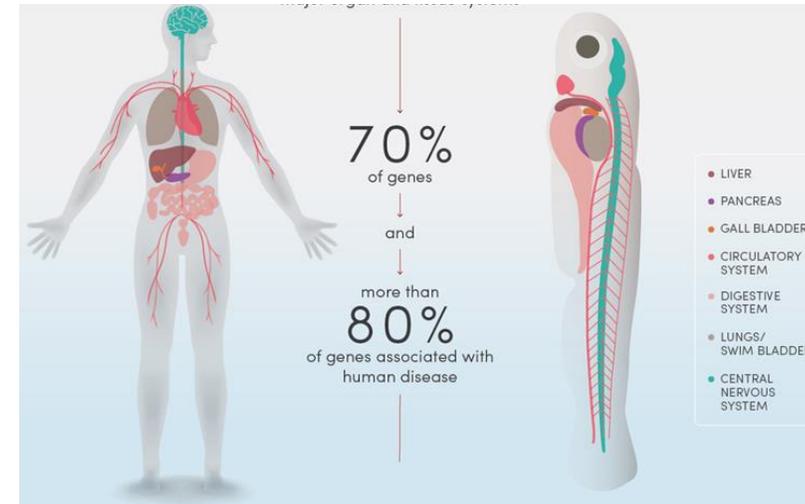
**Specificity** 69.23%

**Accuracy** 67.74%

<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.08.004>

# ¿POR QUÉ USAR EMBRIONES DE PEZ CEBRA?

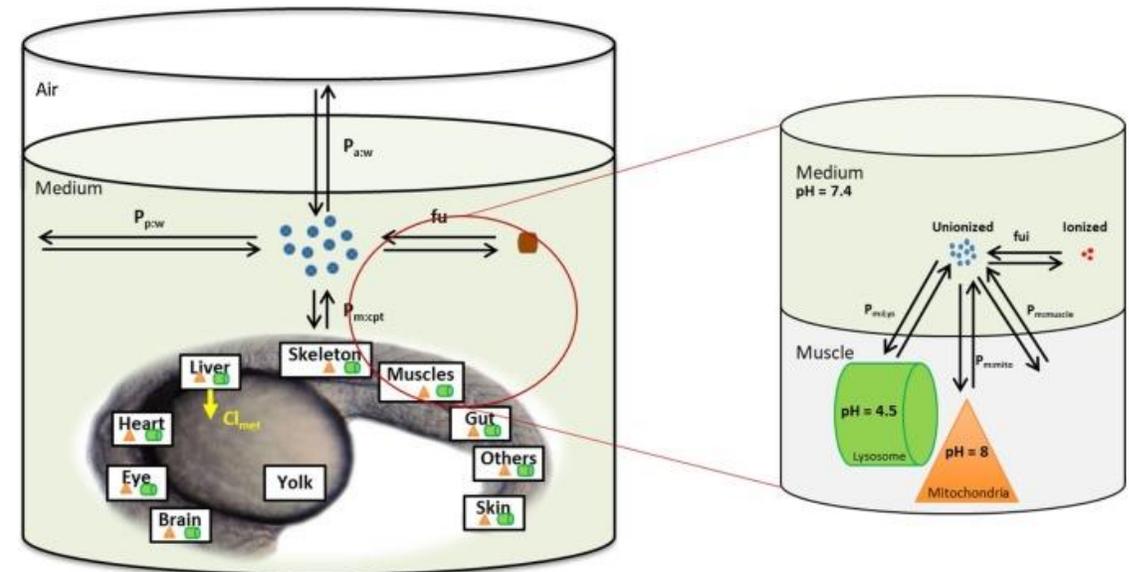
- No requieren aprobación ética según normativa europea.
- Características ventajosas:
  - Desarrollo de órganos muy rápido (24 h)
  - **Similitud genética**: Más del 70% de los genes humanos están presentes en el pez cebra.
  - Similitud de organización corporal y procesos moleculares
  - **Fácil producción** de mutantes/transgénicos
  - Transparencia: Los embriones son **transparentes**, lo que permite observar el desarrollo en tiempo real.
  - Posibilidad de **ensayos automatizados** de alta capacidad (HTS).
  - Flexibilidad de **temperatura** de cultivo (20 - 34 °C)



# COMPARATIVA CON MODELOS IN VITRO

- Más completos que cultivos celulares: **integran la interacción de tejidos y órganos**
- Permite estudiar **efectos a nivel de organismo** en desarrollo
- Efectos en interacciones entre diferentes tipos celulares y órganos
- **Metabolismo** complejo
- Toxicocinética: **ADME**
- Puntos finales complejos

**Ventaja principal → Organismo Completo**



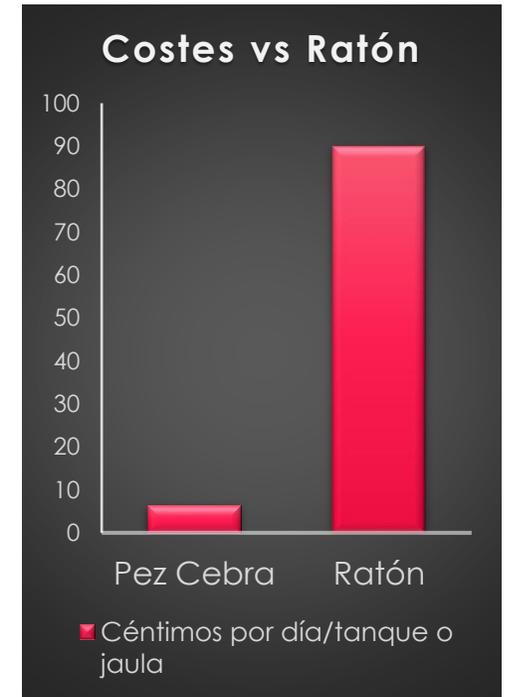
<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.02.010>

# COMPARATIVA CON RATONES REFINAMIENTO

- Mantenimiento: más fácil y barato
- Ética: Métodos menos invasivos

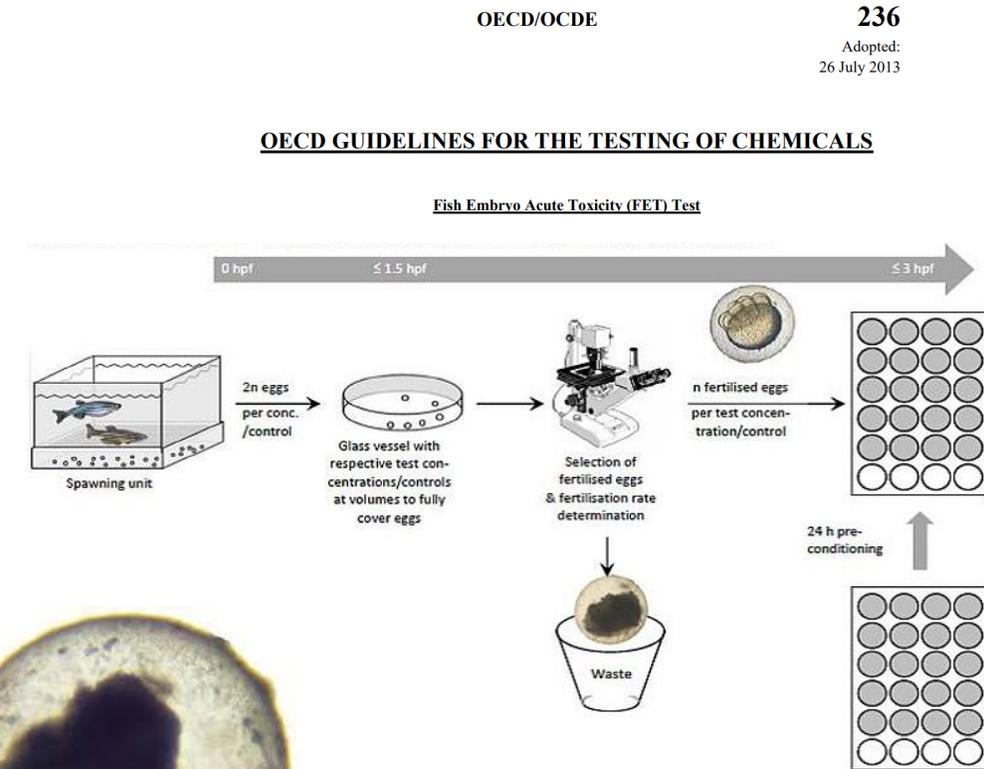
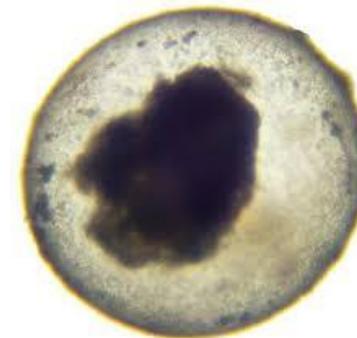
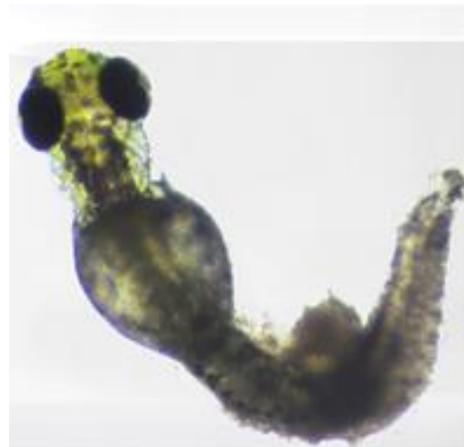
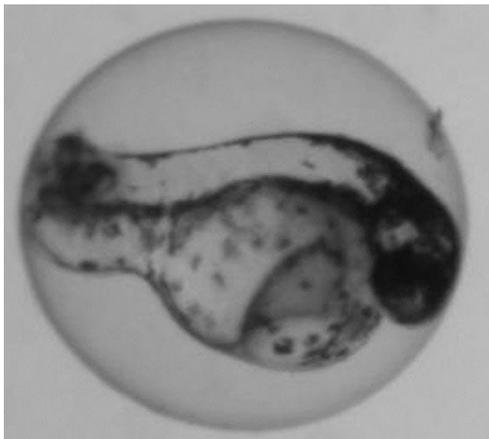


Aspecto	Pez Cebra (Método menos invasivo)	Ratón (Método invasivo)
<b>Observación del desarrollo</b>	Transparencia permite observar tejidos y órganos en vivo con microscopía.	Requiere sacrificio o cirugía para acceder al embrión.
<b>Modelado de enfermedades</b>	Edición genética (CRISPR-Cas9) en embriones transparentes, sin necesidad de cirugía o cruce invasivo.	Requiere manipulación directa de óvulos o cruce de líneas genéticas, con técnicas quirúrgicas.
<b>Estudios de angiogénesis</b>	Visualización de vasos sanguíneos en vivo mediante marcadores fluorescentes.	Uso de cámaras implantadas o estudios post-mortem para evaluar vasos sanguíneos.
<b>Investigación inmunológica</b>	Infecciones inducidas al añadir microorganismos al agua, seguimiento en tiempo real.	Infecciones inducidas por inyecciones directas o procedimientos quirúrgicos.
<b>Pruebas farmacológicas</b>	Administración de fármacos en el agua y evaluación externa de frecuencia cardíaca y movilidad.	Requiere inyecciones intravenosas o intraperitoneales, causando incomodidad al animal.



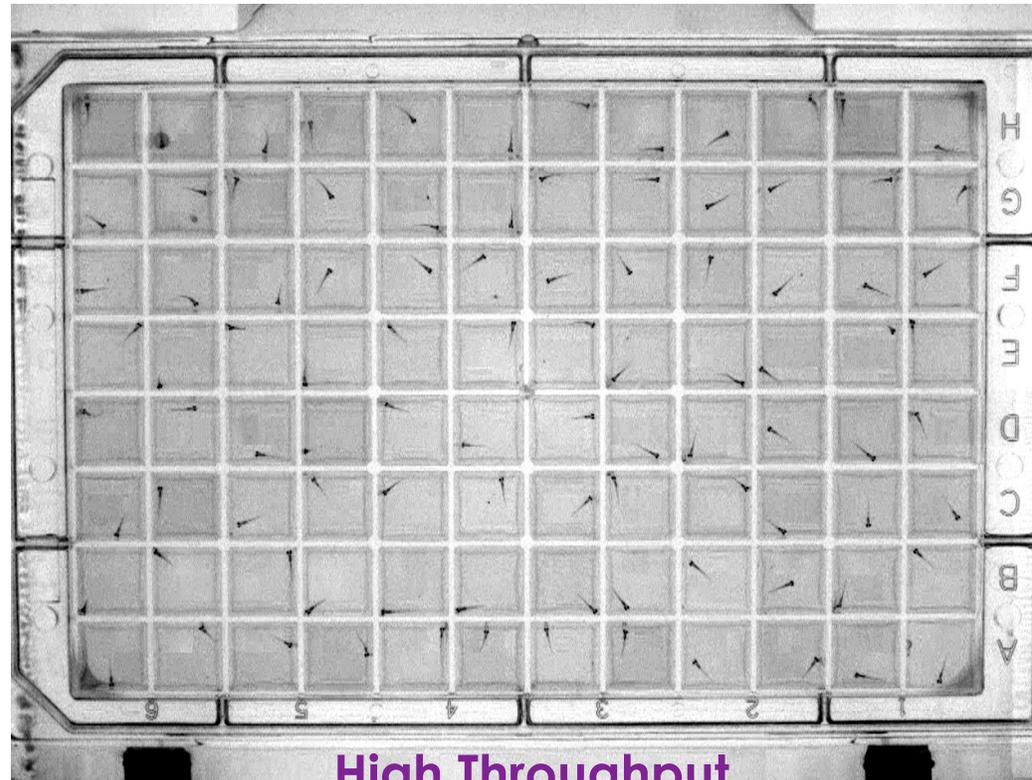
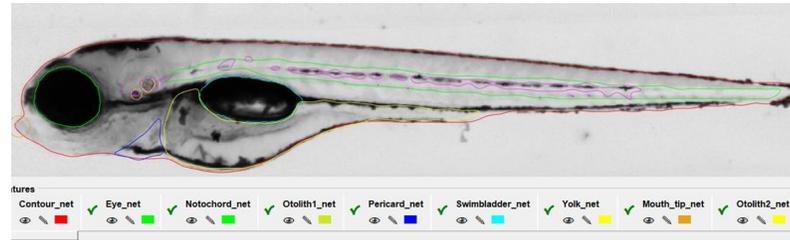
# EVALUACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA EN EMBRIONES

- OECD 236 desde 2013- reemplazo adultos
- Ensayos de toxicidad aguda (letalidad y malformaciones).
- Determinación de la CL50 en compuestos industriales.
- Alteraciones básicas en el desarrollo: edema, escoliosis.
- Alta correlación con letalidad adultos



# EVALUACIÓN DE TOXICIDAD SUBLETAL EN EMBRIONES

- Biometría
- Latido Cardíaco
- Comportamiento



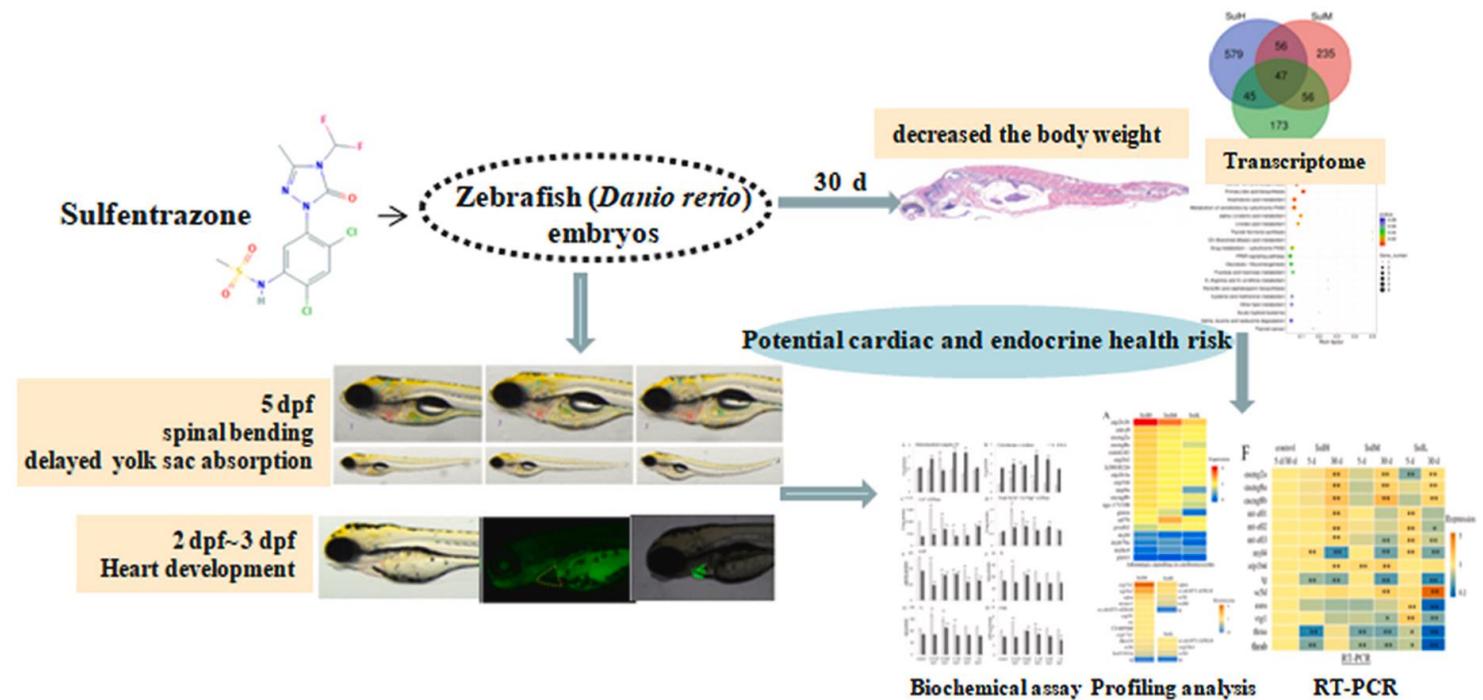
Conc. Tóxico



High Throughput

# EVALUACIÓN DE MODO DE ACCION

- Modulación inmunitaria: Inducción de respuestas proinflamatorias
- Disrupción endocrina: medición de hormonas
- Teratogenicidad
- Cardiotoxicidad
- Genotoxicidad
- Neurotoxicidad
- Hibridación in situ
- Expresión génica
- Microscopía avanzada
- Omicas
- Modelos transgénicos



<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132632>

# LABORATORIO DEL CNSA

## • Instalaciones

- Acuarios de Cristal
- Agua ultrapura con sales
- Limpieza y cuidados
- Medición de parámetros 3 v/s

## • Producción de huevos

- Parideras externas
- Sincronización de puestas
- 100/200 huevos por hembra

## • Aparatos

- Incubadoras - 28°C
- Lupas con sistemas de imagen
- Daniovision – comportamiento



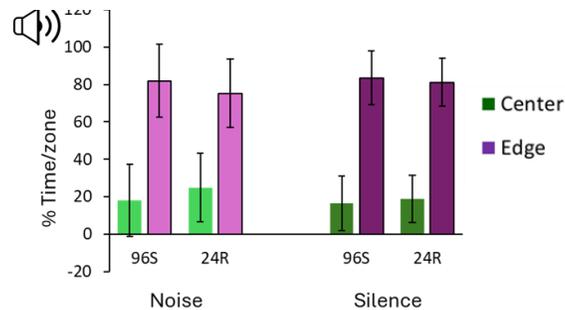
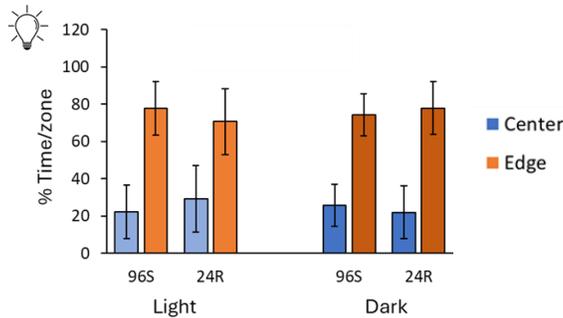
# NUESTRAS INVESTIGACIONES

## Objetivo:

- Rellenar lagunas (*gaps*) en la batería existente de NAMs para evaluar neurotoxicidad en el desarrollo - OECD
- Generar una batería para evaluar **neurotoxicidad aguda**
- **ISCI**: Creación y validación ensayo de **figmotaxis** para evaluar **ansiedad**



PROYECTO  
PARC 5.2.1E



**Development of a High Throughput Thigmotaxis Assay to evaluate Neurotoxicity in Zebrafish Embryos**  
Mónica Torres-Ruiz, María Muñoz-Palencia, Ana Cañas Portilla

**Objective:** Setup a high throughput assay to evaluate toxicant effects on larvae anxiety-like behavior.

**Neurotoxicity (NT)** is mainly studied following guidelines 424 and 425 of the OECD that include behavioral endpoints in rodents such as activity, learning, and memory but do not include endpoints related to anxiety. Moreover, rodent studies are time-consuming, costly, and present ethical issues regarding animal welfare. There is therefore a need for the development of new approach methodologies (NAMs) to evaluate neurotoxicity in a high throughput human relevant manner. The present work will be done within the European Partnership for the Assessment of Risks from Chemicals (PARC), subtask 5.2.1e. In this context the zebrafish embryo (ZFE) up to 120 hours post fertilisation (hpf) is an in vivo model with high human homology but not included in animal welfare regulations and considered a NAM.

**Methods:** Larval stage: 5 days post fertilization. Short Exposure regime: 1 hour (ANT mode). Plates: 24 round and 96 square well plates. Tracking system: Daniovision/Ethovision. Stimuli: Visual and Auditory. Endpoints: Time & distance in plate edge.

**Setting up:**

- Size of central arena in 24 and 96 w.p.
- Control responses in both plate formats
- Comparison of performance of 24 and 96 w.p.
- DMSO solvent effect

**Positive and Negative Control Testing:**

- Substances Tested: Caffeine, Ethanol, Tolipisom, Ibuprofen, Valerianic Acid, Diazepam, Amoxicillin, Saccharin.
- Data shown for 96 well plate format.

**Visual Stimulus:** Dark vs Light.
 

- Tolipisom (mg/L): Ethanol (v/v): Caffeine (mg/L)
- Ibuprofen (mg/L): Valerianic Acid (mg/L): Diazepam (mg/L)
- Saccharin (mg/L): Amoxicillin (mg/L)

**Auditory Stimulus:** Tap vs No Tap.
 

- Tolipisom (mg/L): Ibuprofen (mg/L): Valerianic Acid (mg/L)
- Amoxicillin (mg/L): Saccharin (mg/L): Diazepam (mg/L)

**Conclusions:**

- SETUP: Best results with 448 mm and 969 mm central arenas.
- Control responses similar in both plate formats.
- Low variability and stable throughput with 96 w.p.
- DMSO no effect <math>< 1\%</math>.

**CONTROLS:**

- Anxiolytic positive controls: Tolipisom/Valerianic acid
- Anxiolytic positive: Diazepam (only for Visual Stimulus)
- Negative control candidates: Amoxicillin, Saccharin

**Future Goals:**

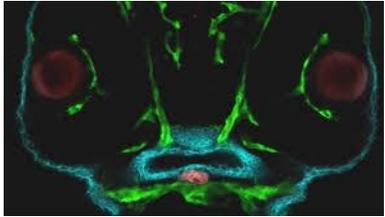
- Test other anxiolytic substances: Alprazolam, Lorazepam
- Test ANT reference chemicals from PARC task WP 5.2.1e
- Test controls in developmental mode (exposure from 0 - 96 hpf)

- El EPC permite estudiar efectos en la ansiedad

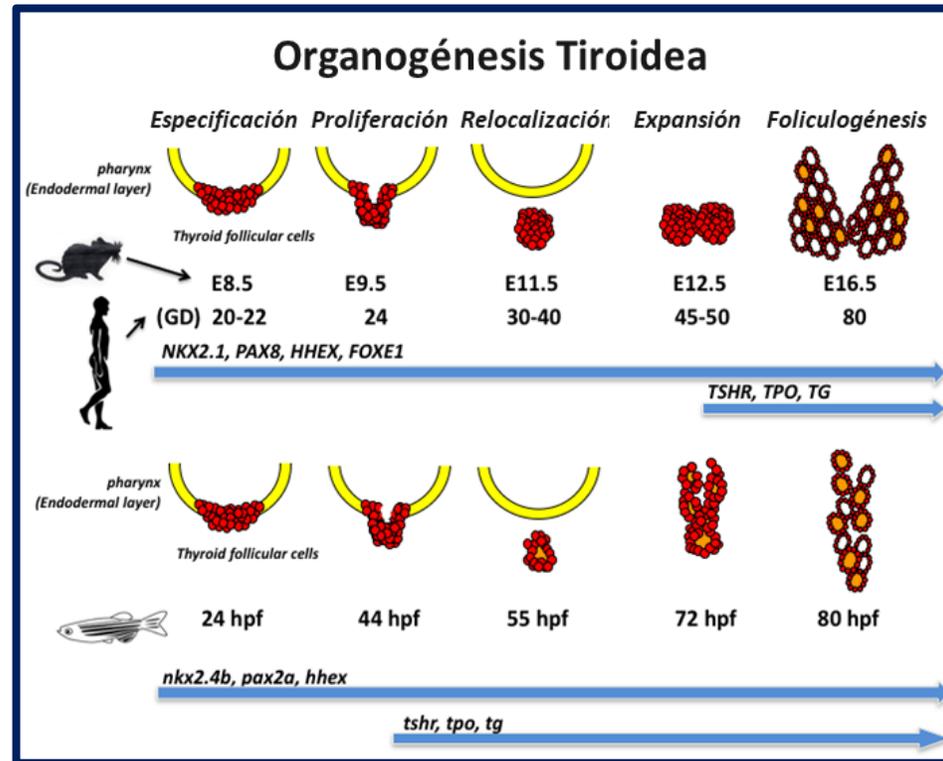
# NUESTRAS INVESTIGACIONES

## Objetivo:

- Batería de NAMs para evaluar disrupción endocrina
- **ISCI**: Creación y validación ensayo de transporte de yodo y hormonas tiroideas



PROYECTO  
PARC 5.2.1C

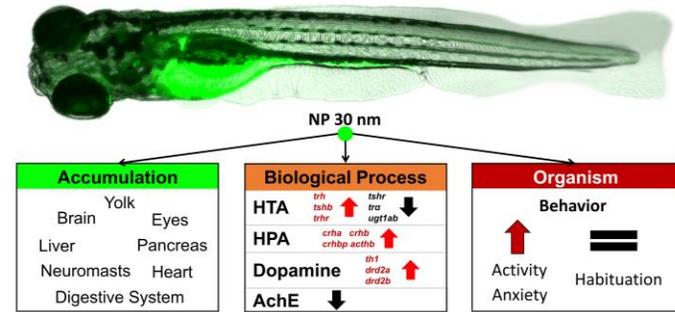
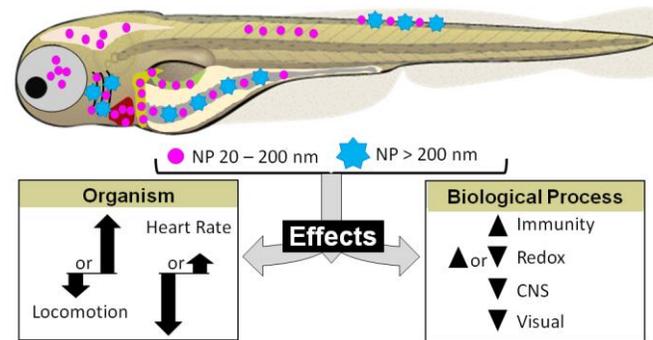
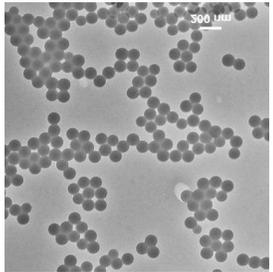


- El EPC permite estudiar efectos de disrupción tiroidea

# NUESTRAS INVESTIGACIONES

## Objetivo:

- Evaluación de efectos en salud de nanoplasticos: comerciales y reales
- Modelo EPC, células, otros organismos (UNED)



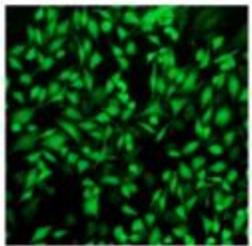
Torres-Ruiz et al. STOTEN 2021

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149125>

Torres-Ruiz et al. STOTEN 2023

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162406>

PROYECTOS  
AES & IMIENS



[NP] 30 nM	Tshb	Tiroides														Tejidos Periféricos							
		Factores Transcripcionales Tiroideos				Proteínas/Genes Tiroideos										HT met.		Transportadores		Deiodinasa			
		Pax 8	Foxe 1	Nkx2.1	Hhex	Tshr	NIS	Slc26a7	Pendrina	Duox 1	Duox 2	Tpo	Tg	DEHAL1	MCT8	MCT10	Ugt1a1	Lat 1	Oatp1c1	Oatp1d1	Dio 1	Dio 2	Dio 3a
C																							
0.01 mg/L																							
0.1 mg/L																							
1 mg/L																							
3 mg/L																							
10 mg/L																							
[NP] 300 nM	Tshb	Tiroides														Tejidos Periféricos							
		Factores Transcripcionales Tiroideos				Proteínas/Genes Tiroideos										HT met.		Transportadores		Deiodinasa			
		Pax 8	Foxe 1	Nkx2.1	Hhex	Tshr	NIS	Slc26a7	Pendrina	Duox 1	Duox 2	Tpo	Tg	DEHAL1	MCT8	MCT10	Ugt1a1	Lat 1	Oatp1c1	Oatp1d1	Dio 1	Dio 2	Dio 3a
C																							
0.01 mg/L																							
0.1 mg/L																							
1 mg/L																							
3 mg/L																							
10 mg/L																							

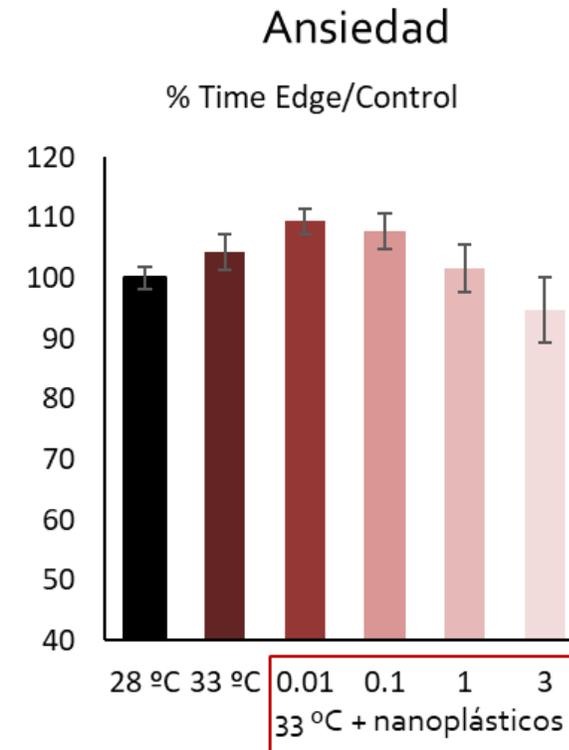
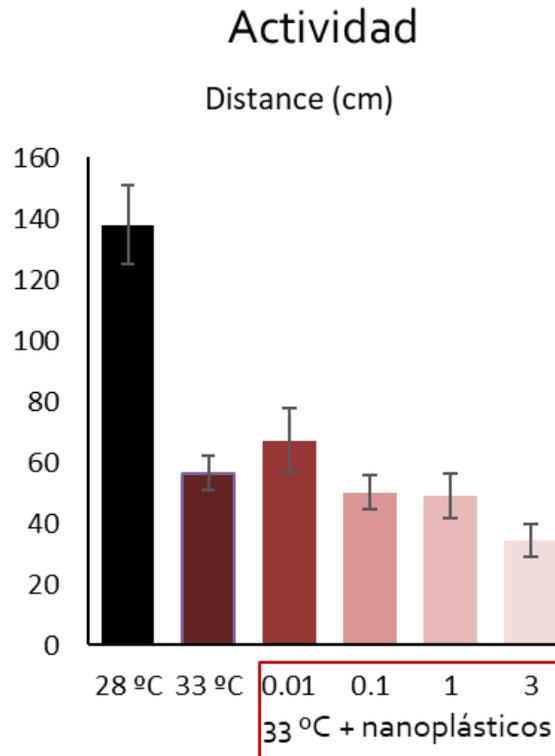
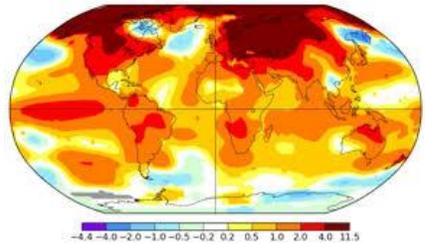
- Los NPs afectan el metabolismo de hormonas tiroideas y el neurodesarrollo

# NUESTRAS INVESTIGACIONES

## Objetivo:

- Efectos combinados de cambio climático, NPs y contaminantes emergentes (PFAS, Bisfenoles)

PROYECTOS  
AES, MICIU &  
IMIENS,

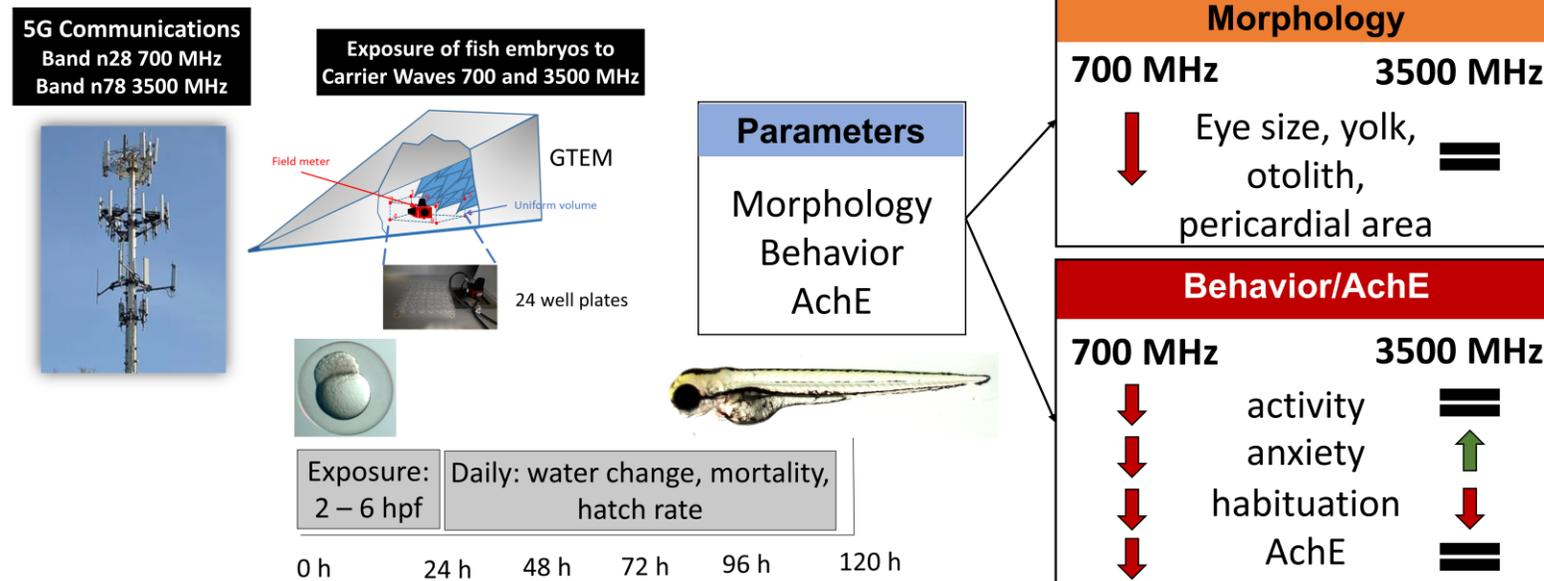


- NPs exacerban el efecto del cambio climático

# NUESTRAS INVESTIGACIONES

## Objetivo:

- Evaluación de efectos en salud de radiaciones 5G
- 700 y 3500 MHz



Torres-Ruiz et al. STOTEN 2024

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.169475>

- Radiaciones 5G alteran el desarrollo y comportamiento

COLABORACIÓN  
TELEMEDICINA

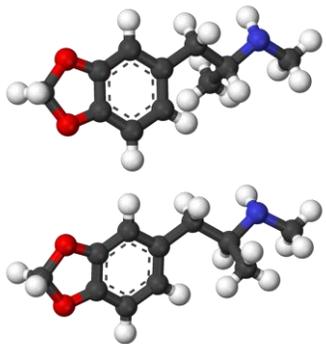


UNIDAD  
RADIACIONES  
NO IONIZANTES

# NUESTRAS INVESTIGACIONES

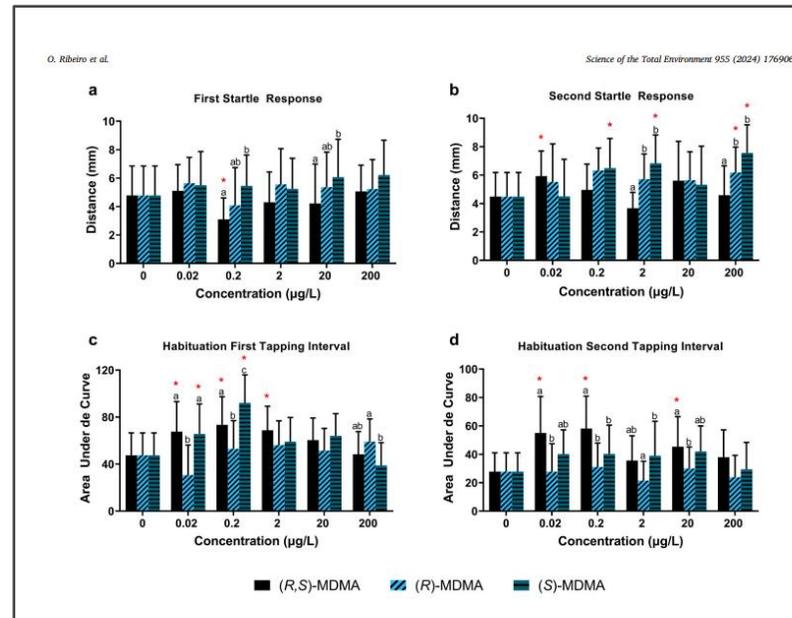
**utad** UNIVERSIDADE  
DE TRÁS-OS-MONTES  
E ALTO DOURO

COLABORACIÓN  
INTERNACIONAL



## Objetivo:

- Efectos en el aprendizaje temprano (habituaación) de drogas recreativas y sus enantiómeros
- Efectos ante estímulos sonoros



❖ Larvas expuestas a enantiomeros tuvieron mayor respuesta de sobresalto que al (R,S)-MDMA

❖ El aprendizaje de larvas expuestas a (R,S)-MDMA fue menor que en controles

Ribeiro et al. STOTEN 2024

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.176906>

- Enantiotoxicidad del MDMA en el aprendizaje temprano

# DESAFÍOS EN EL USO DEL EPC COMO MODELO HUMANO

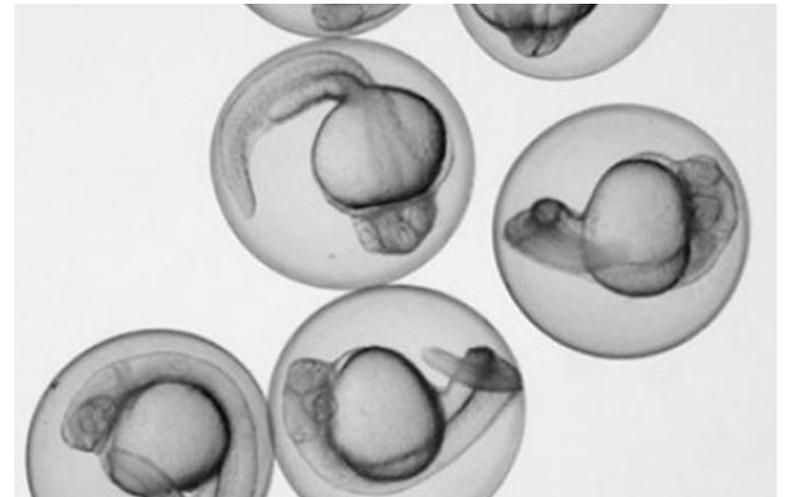
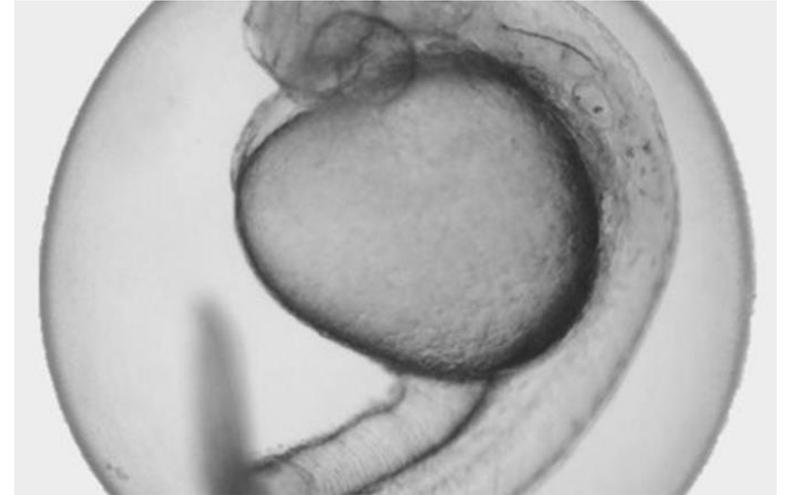


- Falta de placenta
- Compuestos solubles en agua – solventes
- Sistema inmune inmaduro
- Temperatura corporal
- No diferencias por sexo
- No comportamiento social

Criterio	Embrión de Pez Cebra	Ratón
<b>Genética enfermedades</b>	84%	>90%
<b>Sistema inmunológico</b>	Solo Innato, no adaptativo	Sistema inmunológico desarrollado
<b>Temperatura corporal</b>	Ectotermo	Homeotermo
<b>Metabolismo</b>	Metabolismo más rápido	Metabolismo más comparable al humano.
<b>Órganos</b>	No tiene pulmones, estómago, órganos reproductores, mamas	Órganos presentes
<b>Reacciones adversas específicas</b>	Difícil de modelar reacciones adversas específicas humanas.	Mayor capacidad para predecir efectos secundarios humanos.

# CONCLUSIONES

- Los **embriones de pez cebra** son una herramienta clave para avanzar hacia una **toxicología más ética** y eficiente
- Mejoran las baterías de sistemas *in vitro* al ser un **organismo completo** y metabólicamente competente
- Abren nuevas oportunidades para **reducir** el uso de animales protegidos
- Su uso contribuye al **refinamiento** de los experimentos
- Son una herramienta tanto en toxicología como en **biomedicina**
- Permiten un enfoque de **Una Sola Salud** (One Health)





¿PREGUNTAS?