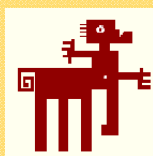


PRIC
2016 - 2017

BANC BIOLÒGIC DEL ZOO DE BARCELONA

INVESTIGACIÓ APLICADA A LA CONSERVACIÓ, TANT IN SITU COM EX SITU A ESCALA GLOBAL

INFORME FINAL



PROGRAMA DE RECERCA I CONSERVACIÓ DEL ZOO DE
BARCELONA **Convocatòria 2016**



Grup de Recerca ERPAW

Departament de Sanitat i Anatomia Animals, Facultat de Veterinària,
Universitat Autònoma de Barcelona

CONTINGUT

1. Dades informatives del projecte
2. Resum del projecte
3. Objectius del Banc Biològic
4. Resultats
5. Informe final dels sol·licitants

1. DADES INFORMATIVES DEL PROJECTE

Àrea

Investigació aplicada a la conservació, tant *in situ* com *ex situ* a escala global.

Tipus de projecte

Programa de Recerca i Conservació del Zoo de Barcelona (Convocatòria 2016 - 2017).

Títol del projecte

Banc Biològic del Zoo de Barcelona.

Equip de treball

Institució: Departament d'Anatomia i Sanitat Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB):

- **Investigador Principal:** Manel López Béjar (DVM, PhD)
- **Tècnic de Suport a la Recerca:** Encarna Casas Díaz (DVM, PhD)
- **Investigador Postdoctoral:** Oriol Talló Parra (DVM, PhD)
- **Investigadora Postdoctoral:** Maria Sabés Alsina (DVM, PhD)
- **Investigadora Predoctoral:** Laura Monclús (DVM, MVSc)
- **Investigadora Predoctoral:** Annaïs Carbajal Brossa (DVM, MVSc)

Termini d'execució

Del 25 de Juny de 2016 al 30 de Setembre de 2017

2. RESUM DEL PROJECTE

El Banc Biològic del Zoo de Barcelona neix a principis del 2014 com a conseqüència de l'augment de sol·licituds de material biològic al Zoo de Barcelona per part de la comunitat científica. El Banc Biològic permet a la comunitat científica d'interès tenir accés a material de qualitat, contribuint en la millora del coneixement que l'ésser humà té sobre l'espècie animal i en el desenvolupament de tècniques, instruments o noves tecnologies que permetin enriquir la consciència i la recerca en el domini de la ciència animal.

Durant els darrers anys de funcionament del Banc, s'han enviat diferents mostres procedents d'una gran varietat de grups animals amb diferents finalitats científiques, aconseguint al mateix temps millorar les connexions i la comunicació entre les diverses entitats sol·licitants. Per altra banda, gràcies a la instauració d'un registre de dades, s'ha permès millorar el control i el moviment de les mostres cedides. Així mateix, l'establiment del Banc permet conèixer la possible disseminació dels resultats en revistes científiques indexades o altres tipus de publicacions.

3. OBJECTIUS DEL BANC

Objectiu principal

Consolidar el Banc Biològic del Zoo de Barcelona fent especial atenció a la difusió i divulgació augmentant així la seva accessibilitat, i millorant la organització per tal de fer més eficient la seva gestió.

Objectius específics

- Potenciar les activitats de divulgació del Banc Biològic del Zoo de Barcelona permetent així una millor i creixent accessibilitat del material per part de tota la comunitat científica d'interès.
- Reforçar la organització bidireccional entre l'immoble on s'origina el material biològic (el Zoològic de Barcelona), les dependències on es gestiona l'ús del material (la Facultat de Veterinària de la UAB), i el centre sol·licitant, amb la finalitat de fer més eficient la seva gestió i control.
- Unificar col·leccions del Banc de Germoplasma amb el Banc de Material Biològic, que ja consta amb material genètic de més de 65 espècies diferents, i fer-lo accessible a la comunitat científica.

Objectius generals

- Millorar i facilitar els estudis científics que impliquin l'ús de material biològic per tal d'obtenir resultats enriquidors i destacables en el seu àmbit.
- Facilitar la col·laboració entre centres de recerca i investigadors.
- Possibilitar l'ús de material procedent d'espècies que només estan a disposició d'una minoria.
- Aprofitar el material biològic procedent de defuncions naturals i reduir així el sacrifici d'animals per al seu ús en la recerca.
- Incrementar les col·leccions incorporant material biològic d'origen divers i de multitud d'espècies.

4. RESULTATS

4.1. Reforçament de la organització bidireccional

Durant aquest darrer any, s'ha afavorit la comunicació entre el personal del Banc Biològic millorant la circulació d'informació dins de l'entitat i amb el Zoo de Barcelona. El reforçament de la comunicació ha permès una millora en la coordinació de tasques i esforços entre el Zoo i el Banc, agilitzant els processos de sol·licitud i cessió de mostres.

4.2. Consolidació del Banc

De forma general, l'activitat del Banc Biològic ha facilitat el desenvolupament de nous i diversos estudis científics possibilitant l'ús de material biològic originat al Zoo de Barcelona, establint així mateix noves connexions i col·laboracions entre centres de recerca. A més, la col·lecció de material ha seguit incrementant, i ha pogut ser aprofitat per diversos investigadors reduint així el sacrifici d'animals per a ser usats en recerca.

4.3. Final Report

El document elaborat el darrer any, en que es demanava als sol·licitants un informe final específic, ha permès millorar el coneixement sobre l'ús de les mostres concedides. A més, s'ha aconseguit obtenir informació sobre objectius no complerts, mostres no usades, entre d'altres, permetent identificar possibles obstacles i/o dificultats en l'ús de les mostres, i millorant així el serveix ofert als sol·licitants. Aquesta eina també ha permès realitzar un millor seguiment dels resultats obtinguts i de la seva disseminació.

S'adjunten els informes finals més significatius dels sol·licitants de material biològic (apartat 5. *Informe final dels sol·licitants*).

4.4. Banc de germoplasma

Aquesta branca del Banc Biològic, que es dedica principalment a l'obtenció, processament i conservació de germoplasma i teixits o cèl·lules somàtiques, ha seguit

aquest any augmentant la seva col·lecció amb mostres de noves espècies i individus del Zoològic de Barcelona. Les mostres també es troben a disposició de tota la comunitat científica interessada en la conservació i preservació de la diversitat genètica. A més, durant el congrés internacional de l'Associació Europea de Zoos i Aquaris (EAZA) que va tenir lloc a Holanda el passat setembre de 2017, es va fer difusió de les funcions que exerceix el Banc de germoplasma i dels seus principals resultats, divulgant així un dels objectius bàsics del Banc; la voluntat d'arribar a tota la comunitat científica d'interès.

4.5. Ampliació de la col·lecció

La col·lecció del Banc Biològic ha incrementat durant el darrer any, tant en número de mostres com en la qualitat d'elles. S'ha seguit ampliant l'origen de les mostres, de forma que la col·lecció del Banc està formada en gran mesura per mostres originades en el mateix Zoo de Barcelona però també consta de mostres d'altres procedències. Així doncs, actualment el Banc Biològic aporta a la comunitat científica mostres de fauna autòctona i al·lòctona, tant d'animals domèstics com salvatges, ja siguin en captiveri o en estat lliure, oferint un ampli ventall d'oportunitats per a realitzar recerca de qualitat en diferents àmbits.

5. INFORME FINAL DELS SOL·LICITANTS

A continuació s'adjunten els informes finals més significatius dels sol·licitants de material biològic. Aquests documents que els sol·licitants lliuren al Banc un cop finalitzada la seva recerca permet millorar diversos procediments relacionats amb el manteniment, la sedició i el retorn de mostres, així com també la relació entre el Banc Biològic i els investigadors interessats en adquirir-ne part de la seva col·lecció per a finalitats científiques.



FINAL REPORT

Please complete this form, and return by email (fully signed). Add attachments as appropriate.

DATE of sample request: 25/02/2016

DATE of final report: 08/09/2017

REQUESTER

Surname(s)	Mitjans
Name(s)	Francesc
Institution	Acondicionamiento Tarrasense, LEITAT Technological Center
Department	Health & Biomedicine Division
Address	c/ Baldiri Reixach 15-21, 08028 Barcelona
Phone #	934 020 417
Email	fmitjans@leitat.org
Web page	www.leitat.org

SAMPLES REQUESTED

Species guanaco (*Lama guanicoe*)

Type of sample(s) whole blood

Number of samples 1

Samples identification -

SAMPLES USE

All the samples provided have been used? Yes / No Yes

If not, list which ones have not been used and briefly state why -

Explain if the samples have undergone any modification process and list which ones

Whole blood has been incubated with EDTA before the extraction of total cellular RNA from lymphocytes.

Will the samples be returned to the Biological Bank after its use? Yes / No No

Expected date of samples hand back: -

PROJECT

Project title Generation of a naïve nanobody library from camel lymphocytes

Project duration 1 year

Principal investigator (incl. position) Francesc Mitjans, PhD

Project abstract

Monoclonal antibodies (mAbs) are heterodimeric proteins consisting of two identical heavy chains and two identical light chains. The specific conformation at the hypervariable zone of these chains allows the specific recognition of different antigens. Accordingly, mAbs represent a good diagnostic tool for the detection of biomarkers, as well as a good tool for therapeutic intervention in various diseases.

However, one of the biggest handicaps of mAbs is its large size. The approximately 150 kDa confers to these biomolecules some limitations in terms of production properties, stability, etc.

Recently it was reported that the camelid family, in addition to the double-chain monoclonal antibodies, have other single chain antibodies. Later, via molecular engineering, researchers from different centers cloned the hypervariable region of these single chain antibodies and found that they kept the specificity for the antigens.

These small fragments of single chain antibodies are known as nanobodies and can be produced in prokaryotic cells, maintaining the advantages of conventional mAbs and avoiding the handicaps discussed above.

In this project a library of native nanobodies will be obtained from lymphocytes of Camelids.

OUTCOMES

1. Development of the objectives

State the objectives and describe the degree of accomplishment with the samples supplied

- Objective 1: Amplification of camel nanobody sequences by PCR
Degree of achievement: 100%
- Objective 2: Cloning of nanobody sequences into phagemid vector
Degree of achievement: 100%
- Objective 3: Characterization of the nanobody library
Degree of achievement: 100%

2. Assays or activities performed

Describe the assays or activities performed to reach the objectives

Total cellular RNA has been extracted from camel lymphocytes. Then cDNA has been synthesized and specific nanobody sequences have been amplified by PCR. These DNA fragments have been purified and cloned into a phagemid vector in able to express the antibodies as bacteriophages. *Escherichia coli* cells have been transformed with the phagemid to generate a naïve nanobody library. Finally, the efficiency and variability of the library has been characterized.

3. Results

State the results obtained

A naïve nanobody library has been generated from guanaco. The efficiency of the library is $3,8 \times 10^7$ cfu/ml. PCR screening of individual colonies yields 100% of nanobody sequences.

DISSEMINATION OF RESULTS

Describe the dissemination of the results (Peer-reviewed journal articles, congress, conferences or workshops, etc.). Please, provide all the relevant information.

These results have not been yet published neither presented in any meeting.

Name: **Francesc Mitjans**

Signature:





FINAL REPORT

Please complete this form, and return by email (fully signed). Add attachments as appropriate.

DATE of sample request:

DATE of final report: 19, SEPTIEMBRE, 2017

REQUESTER

Surname(s)	MARTÍNEZ MARTÍNEZ
Name(s)	JORGE
Institution	UAB
Department	SANITAT I ANATOMIA ANIMALS
Address	FACULTAT DE VETERINÀRIA, TRAVESSERA DELS TURONS, S/N
Phone #	+34-935814567
Email	Jorge.martinez.martinez@uab.cat
Web page	

SAMPLES REQUESTED

Species WARTHOGS

Type of sample(s) FECES

Number of samples 5

Samples identification WH1, WH2, WH3, WH4, WH5

SAMPLES USE

All the samples provided have been used? Yes / No YES

If not, list which ones have not been used and briefly state why

Explain if the samples have undergone any modification process and list which ones

Will the samples be returned to the Biological Bank after its use? Yes / No

NO

Expected date of samples hand back:

PROJECT

Project title

Estrategias de protección frente a la Peste porcina Africana: de la investigación básica a la aplicada

Project duration

2017-2019

Principal investigator (incl. position)

DR. FERNANDO RODRÍGUEZ, DIRECTOR DEL CRESA-IRTA

Project abstract

La Peste Porcina Africana (PPA) es una de las enfermedades virales (producida por el virus de la PPA) del porcino más devastadoras que existen. La ausencia de tratamientos o vacuna eficaces contra la enfermedad dificultan aún más su control, a día de hoy basado en el diagnóstico precoz de la enfermedad y en el sacrificio masivo de animales infectados o en contacto con el virus. Este tipo de medidas, muy discutidas desde el punto de vista ético, han resultado sin duda eficaces hasta el momento en los países que se lo han podido permitir (caso de España y Portugal en los noventa gracias al apoyo de la UE), pero resulta sin embargo inviable en zonas económicamente más desfavorecidas, como es el caso actual de la mayoría de países Africanos donde el virus se encuentra de forma endémica desde hace décadas o de Rusia y de los países del Cáucaso donde el virus circula a sus anchas desde su entrada en Georgia en el año 2007. Así pues, desarrollar tratamientos y vacunas eficaces para la enfermedad resulta absolutamente necesario. Con este objetivo en mente, presentamos aquí una propuesta basada prácticamente en su totalidad en resultados obtenidos en los laboratorios de los dos equipos de investigación participantes del CBMSO (CSIC-UAM (Madrid) y del CReSA-IRTA (Barcelona). La colaboración de los últimos años entre ambos grupos ha permitido aplicar los últimos avances moleculares y de conocimiento básico sobre el virus, al desarrollo de tecnologías que han permitido conocer mucho mejor los mecanismos implicados en protección frente al virus y al desarrollo de prototipos vacunales muy prometedores, hasta el punto de haber podido ensayar in vivo un prototipo vacunal obtenido en conjunto (BA71CD2KO) y recientemente patentado en colaboración con nuestro socio industrial Boehringer Ingelheim (vet R&D, Hannover, Germany). BA71CD2KO no sólo es capaz de conferir protección homóloga, sino que por primera vez para el caso de la PPA, confiere protección frente a virus heterólogos incluyendo Georgia07, virus circulando actualmente en Europa. A pesar de su eficacia, BA71CD2KO ha de ser mejorado esencialmente tanto en bioseguridad como en su capacidad de inducir anticuerpos

diferenciales de las cepas de VPPA potencialmente circulantes (concepto DIVA); conceptos ambos esenciales a la hora de comercializar una vacuna en países libres de la enfermedad. Un buen ejemplo que ilustra las complicaciones añadidas que supone sacar al mercado una vacuna frente a un virus “exótico”, viene ilustrado por los casos de la Peste porcina Clásica y de la Fiebre Aftosa, dos enfermedades que como la PPA, son de declaración obligatoria a la organización mundial de salud animal (antigua OIE) y para las que existen eficaces vacunas comerciales basadas en virus atenuados o inactivados y que sin embargo ven restringida su utilización en la UE, prefiriendo adoptar una política de diagnóstico y sacrificio (“stamping out” del inglés). Con toda esta información en mente nos proponemos desarrollar dos objetivos principales: 1) Entender mejor los procesos de entrada y salida del VPPA, eventos básicos tanto desde el punto de vista de la investigación básica sobre el virus como por su posible aplicación futura al desarrollo de estrategias antivirales y 2) Optimizar el potencial vacunal de BA71CD2KO, principalmente desde el punto de vista de su bioseguridad y capacidad DIVA.

OUTCOMES

1. Development of the objectives

State the objectives and describe the degree of accomplishment with the samples supplied

- Objective 1: FECAL TRANSPLANTATION IN PIGS WITH WARTHOG FECES
Degree of achievement: The experiment was developed in June 2017 and positive results were obtained.
- Objective 2: ASFV INFECTION IN PIGS TRANSPLANTED WITH WARTHOG FECES
Degree of achievement: The experiment was developed in July 2017 and positive results were obtained.
- Objective n:
Degree of achievement:

2. Assays or activities performed

Describe the assays or activities performed to reach the objectives

Fecal transplantation in pigs with warthog feces. 3-weeks-old piglets were orally inoculated with a suspension of warthog feces. At 15 days postinoculation there changes in the microbiota in transplanted piglets. Afterwards, piglets were infected with ASFV in the BSL3 facility of IRTA-CRESA.

3. Results

State the results obtained

At 15 days postinoculation there changes in the microbiota in transplanted piglets. Transplanted piglets showed differences regarding viral replication compared to non-transplanted piglets.

DISSEMINATION OF RESULTS

Describe the dissemination of the results (Peer-reviewed journal articles, congress, conferences or workshops, etc.). Please, provide all the relevant information.

Two manuscripts are being written to be submitted to peer-reviewed journals. Congress abstracts are also considered in a close future.

Name: JORGE MARTÍNEZ MARTÍNEZ

Signature:

A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized, cursive script that is difficult to decipher but appears to be the name of the person listed above.



FINAL REPORT

Please complete this form, and return by email (fully signed). Add attachments as appropriate.

DATE of sample request:

DATE of final report: 14-September-2017

REQUESTER

Surname(s): Avilés Sánchez

Name(s): Manuel

Institution: Faculty of Medicine. University of Murcia

Department: Cell Biology and Histology

Address: Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Medicine, Biomedical Research Institute of Murcia (IMIB-Arrixaca-UMU), University of Murcia, 30100, Murcia, Spain.

Phone: +34 868884385

Email: maviles@um.es

Web page

SAMPLES REQUESTED

Species: *Zalophus californianus*

Type of sample(s): Tissue

Number of samples: 1

Samples identification: Zalophus DNA

SAMPLES USE

All the samples provided have been used? Yes

If not, list which ones have not been used and briefly state why

Explain if the samples have undergone any modification process and list which ones:
DNA isolation

Will the samples be returned to the Biological Bank after its use? No

Expected date of samples hand back:

PROJECT

Project title:

Analysis of *ZP1* gene reveals differences in zona pellucida composition in carnivores.

Project duration: 1 year.

Principal investigator (incl. position): Avilés Sánchez M and Izquierdo-Rico MJ.

Project abstract:

The zona pellucida (ZP) is an extracellular envelope that surrounds mammalian oocytes. This coat participates in the interaction between gametes, induction of the acrosome reaction, block of polyspermy and protection of the oviductal embryo. Previous studies suggested that carnivore ZP was formed by three glycoproteins (ZP2, ZP3 and ZP4), with *ZP1* being a pseudogene. However, a recent study in the cat found that all four proteins were expressed. In the present study, *in silico* and molecular analyses were performed in several carnivores to clarify the ZP composition in this order of mammals. The *in silico* analysis demonstrated the presence of the *ZP1* gene in five carnivores: cheetah, panda, polar bear, tiger and walrus, whereas in the Antarctic fur seal and the Weddell seal there was evidence of pseudogenisation. Molecular analysis showed the presence of four ZP transcripts in ferret ovaries (ZP1, ZP2, ZP3 and ZP4) and three in fox ovaries (ZP2, ZP3 and ZP4). Analysis of the fox *ZP1* gene showed the presence of a stop codon. The results strongly suggest that all four ZP genes are expressed in most carnivores, whereas *ZP1* pseudogenisation seems to have independently affected three families (Canidae, Otariidae and Phocidae) of the carnivore tree.

OUTCOMES

1. Development of the objectives

State the objectives and describe the degree of accomplishment with the samples supplied

- Objective 1: *ZP1* gene amplification

Degree of achievement: Part of the *ZP1* gene was amplified, but the fragments we were interested in, to see if *ZP1* was pseudogenized in this species had low quality; thus we could not conclude anything by molecular analysis.

- Objective 2:

Degree of achievement:

- Objective n:

Degree of achievement:

2. Assays or activities performed

Describe the assays or activities performed to reach the objectives

DNA isolation with the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)

PCR amplification

Agarose electrophoresis

PCR-amplified product purification with the DNA Clean and Concentrator-5 kit (Zymo Research)

Automatic sequencing with a 3500GeneticAnalyzer (Applied Biosystemss)

3. Results

State the results obtained:

DNA was isolated from the sample provided and part of the *ZP1* gene was amplified, however as we explained before we could not conclude anything about the pseudogenization by molecular analysis. However, by *in silico* analysis it was concluded that this gene was pseudogenized in a close relative species, the Antarctic fur seal (*Arctocephalus gazelle*), which belongs to the same subfamily Otariidae, for that similarity searches were performed using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) and BLAST-like Alignment Tool (BLAT) the draft genome assembly of the Antarctic fur seal, recently published by Humble et al. (2016) and downloaded from Dryad Digital Repository.

DISSEMINATION OF RESULTS

Describe the dissemination of the results (Peer-reviewed journal articles, congress, conferences or workshops, etc.). Please, provide all the relevant information.

A manuscript about carnivore phylogeny and evolution has been published in *Reproduction, Fertility and Development* entitled: Analysis of ZP1 gene reveals differences in zona pellucida composition in carnivores by Moros-Nicolás et al., 2017.

However, we could not include results about the *Zalophus californianus* sample as we did not obtain positive results.

Name: Manuel Avilés Sánchez

Signature: