

EFFECTO DE LA TICLOPIDINA EN LOS CAMBIOS MORFOLÓGICOS DE CULTIVOS ENDOTELIALES INDUCIDOS POR LA INTERACCIÓN ENDOTOXINA-PLAQUETA

Nina Martínez de Lima*

RESUMEN: La endotoxina (lipopolisacárido) induce estados trombogénicos en el shock séptico. La agregación plaquetaria inducida por lipopolisacárido es inhibida por ticlopidina. Investigamos si ticlopidina podía modificar el efecto de la interacción lipopolisacárido - plaqueta sobre la morfología de cultivos endoteliales. Las células fueron aisladas de la microvasculatura dérmica de embriones de rata. Los cultivos fueron incubados con: lipopolisacárido; lipopolisacárido + plasma rico en plaquetas; lipopolisacárido + plasma rico en plaquetas de ratas pretratadas con ticlopidina; lipopolisacárido + solución de ticlopidina; lipopolisacárido + plasma rico en plaquetas + solución de ticlopidina; solución de ticlopidina. Se evidenció daño celular con lipopolisacárido, que se acentuó en presencia de plasma rico en plaquetas, pero con plasma rico en plaquetas procedente de ratas pretratadas con ticlopidina, estas alteraciones no estuvieron presentes. En conclusión ticlopidina suprimió las alteraciones derivadas de la interacción lipopolisacárido - plaqueta sobre el endotelio por lo que podría tener un potencial terapéutico en el shock séptico.

Palabras clave: Lipopolisacárido, Ticlopidina, Plaquetas, Células endoteliales.

ABSTRACT: Endotoxin (lipopolysaccharide) contributes to the thrombogenic state, in the septic shock. Platelet aggregation induced by lipopolysaccharide is inhibited by ticlopidine. We investigated if ticlopidine could modify the effect of the lipopolysaccharide -platelets interaction, on endothelial cell morphology. The endothelial cells were isolated from rat embryos dermal microvasculature. The cultures were incubated with: lipopolysaccharide; lipopolysaccharide + platelet rich plasma; lipopolysaccharide + platelet rich plasma from rats treated with ticlopidine; lipopolysaccharide + ticlopidine solution; lipopolysaccharide + control platelet rich plasma + ticlopidine; ticlopidine solution. The results evidenced cytoplasmic alterations with lipopolysaccharide. This cellular damage was strengthened by platelet rich plasma; however, in the presence of platelet rich plasma from rats pretreated with ticlopidine, these changes did not become present. We concluded that ticlopidine suppresses some derived adverse effects of the lipopolysaccharide -platelet interaction on the endothelium, thus ticlopidine could have a therapeutic potential on septic shock.

Key words: Lipopolysaccharide, Ticlopidine, Platelets, Endothelial cells.

INTRODUCCIÓN

El shock séptico constituye una causa importante de morbilidad y mortalidad⁽¹⁾. En su patogenia ha sido implicada la endotoxina⁽²⁾, lipopolisacárido (LPS) constituyente de la pared celular de las bacterias gramnegativas, que contribuye a la integridad estructural

y protegerlas contra las defensas inmunes del huésped. Después de la lisis bacteriana la endotoxina liberada hacia la circulación es capaz de activar el sistema inmunológico por estimulación de monocitos, macrófagos, neutrófilos, plaquetas y células endoteliales⁽³⁾. Esta activación ocurre a través de su unión con una proteína de fase aguda, conocida como LBP (*Lipopolysaccharide Binding Protein*) con la cual forma un complejo que incrementa su actividad tóxica y su afinidad por receptores celulares a LPS. El complejo LPS- LBP entra en contacto

* Mg Sc. Profesora Asociada. Cátedra de Fisiopatología. Escuela de Medicina J. M. Vargas. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.
Este trabajo fue financiado por CDCH-UCV Proyecto individual N° 09-005570-2004.
Recibido: 02-02-07.
Aceptado: 15-06-07

con el monocito a través de un receptor específico de membrana (CD14) también presente en células inmunocompetentes, el cual al ser activado, transmite una señal intracelular a través de un complejo receptor conocido como Toll-like (TLR4 para gramnegativos y TLR2 para grampositivos) y sus moléculas accesorias (MD-2)^(4,5), conduciendo a la activación de mediadores intracelulares (proteína kinasas y NFκB) que resultan en la inducción de genes antimicrobianos y citokinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral. La acción de las células activadas por LPS, junto a los efectos de los mediadores de inflamación causa fiebre, lesión endotelial, aumento de permeabilidad capilar, dilatación vascular, trastornos de coagulación, trombosis y depresión miocárdica, condiciones que de no ser adecuadamente controladas pueden llevar a la falla multiorgánica y a la muerte por *shock séptico*⁽¹⁾. La LPS también estimula células CD14 negativas, como son las células endoteliales y los fibroblastos. Este efecto parece ser mediado por formas solubles del receptor CD14 que son secretados por los monocitos/macrófagos permitiendo una función activadora de la LPS a distancia⁽⁶⁾. Las células endoteliales, parecen jugar un papel clave dentro de la fisiopatología de la interacción endotoxina-huésped, al generar y al mismo tiempo ser blanco de la acción de muchos mediadores⁽⁷⁾. Se ha propuesto que la intensa activación endotelial seguida por su disfunción y eventual injuria es lo que conduce a la falla multiorgánica del shock, a través de la formación de agregados de leucocitos y plaquetas^(8,9) con reducción de la perfusión, hipoxia y la consecuente falla de órganos y sistemas.

Las alteraciones morfológicas y funcionales de las células endoteliales durante la sepsis podrían conducir a un disturbio microcirculatorio, generador de complicaciones como la coagulación intravascular diseminada y falla multiorgánica. Asimismo las plaquetas estimuladas por la endotoxina, podrían contribuir a la inducción de un estado trombogénico del endotelio⁽⁹⁾.

En trabajos anteriores, pudimos comprobar que la ticlopidina, (Tc) un antiagregante plaquetario, tiene piridinico, era capaz de inhibir "*ex vivo*" la agregación plaquetaria inducida por LPS, la cual tiene la singularidad de no ser inhibida por agentes antiagregantes convencionales⁽¹⁰⁾. Este agente administrado "*in vivo*" redujo la trombocitopenia y otras alteraciones hemostáticas que se producen en la rata por la administración de LPS, al tiempo que redujo la mortalidad de 60 % a 9 %⁽¹¹⁾.

El objetivo del presente trabajo fue determinar si la

interacción endotoxina-plaqueta era capaz de producir cambios morfológicos detectables a la microscopia de luz, en cultivos de células endoteliales de rata y si los mismos podían ser atenuados por el efecto de la ticlopidina en plaquetas.

MÉTODO

Reactivos: 1. Lipopolisacárido de *E. coli* 0127:B8 Casa Difco, Detroit, Michigan, EE.UU. 2. Clorhidrato de ticlopidina. Laboratorios Leti, S.A.V. 3. Dispasa II. Lab Roche, Alemania.

Animal de experimentación: 1. ratas albinas preñadas, de 270 g de peso, de la cepa Sprague-Dawley, alimentadas ad libitum, las cuales fueron manejadas siguiendo los principios éticos que se especifican en el Código Internacional que rige la Investigación Biomédica con animales de laboratorio^(22, 23) 2. Como donantes de plasma rico en plaquetas (PRP) ratas machos de la misma cepa y de 350 g de peso. Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico al 3 % a la dosis de 30 mg/kg por vía ip.

Obtención de PRP: los PRP fueron obtenidos tomando el sobrenadante luego de centrifugar muestras de 10 mL de sangre heparinizada, a 150-200 g por 15 min. La sangre se tomó por punción cardíaca, tanto de ratas controles, como de ratas pre tratadas con ticlopidina.

Tratamiento con ticlopidina: 3 ratas fueron tratadas con inyección intravenosa vena de la cola) con ticlopidina a la dosis 10 mg/kg a razón de una dosis cada 24h por tres días. (Solución 1,5 %, pH 7,4). A las 48 horas de la última dosis, los animales eran anestesiados y se les extraía sangre por punción cardíaca, la cual era centrifugada de acuerdo a lo descrito para obtener PRP.

Parte del PRP era probado en un agregómetro (Chronolog) frente a 5 µg/mL de LPS a fin de demostrar la inhibición de la agregación plaquetaria la cual es obtenida con este tratamiento en un 80 % de acuerdo a resultados previos⁽¹⁰⁾ El resto del PRP (inhibido por ticlopidina) era reservado para su incubación con los cultivos endoteliales de acuerdo al diseño experimental.

Aislamiento y cultivo de células endoteliales: las células endoteliales fueron obtenidas a partir de la vasculatura de la dermis de embriones de ratas de 20 días, los cuales fueron extraídos del útero materno en condiciones de asepsia. Se cortaron segmentos de piel de 1 cm², los cuales se incubaron en solución de Dispasa tipo II (2.4 Unid/mL) por 24h a 4° C a fin de separar la dermis de la epidermis. Las dermis fueron lavadas y raspadas

con el borde curvo de una pinza, para desprender y extraer las células endoteliales. El cultivo primario se realizó en frascos de cultivo de 25 mL a razón de 450 000 células e incubados en estufa a 37° C con atmósfera de CO₂ al 5 %. El cultivo semiconfluyente de 8 días de crecimiento, fue procesado para lograr una concentración de 35 000 células por mL distribuyéndolas en alícuotas de 1 mL en tubos de Leighton con 60 % de medio Dulbecco, 30 % de medio F12 y 10 % de suero fetal de ternera; además de penicilina (100 Unid/mL), anfotericina B (2 mg/mL) y adenina sulfato a la dosis de 24 mg/mL, a fin de atenuar el crecimiento de los fibroblastos. Los tubos fueron incubados en estufa a 37° C con 5 % de CO₂ por 36 horas.

Diseño experimental: finalizado este período se procedió a realizar el ensayo experimental de acuerdo al diseño presentado en la Tabla 1. Los tubos de cultivo fueron agrupados en 6 grupos. Cada grupo estaba constituido por 6 tubos de cultivos. **Grupo A:** constituyeron los cultivos de endotelio control; **Grupo B:** estaban destinados a evaluar el efecto directo de la LPS sobre el endotelio; **Grupo C:** destinado a estudiar el efecto de las plaquetas sobre las células endoteliales en presencia de LPS. **Grupo D:** fueron destinados a estudiar el efecto sobre el endotelio, de LPS y **plaquetas inhibidas** por ticlopidina *in vivo*. **Grupo E:** dirigido a estudiar si la ticlopidina añadida directamente modificaba el efecto de la LPS sobre los cultivos. La ticlopidina fue preparada a la concentración de 60 mg/mL de PBS. Finalmente los

tubos del Grupo F estuvieron dirigidos a evaluar el efecto de las plaquetas sobre las células endoteliales.

Todos los tubos fueron llevados a estufa durante una hora, finalizada la cual se extrajeron las laminillas de los tubos de Leighton, las cuales se fijaron y colorearon (May Grumwals-Giemsa) para su análisis morfológico. La naturaleza endotelial de las células fue demostrada con anticuerpos contra el factor VIII antigénico endotelial y la reacción se evidenció con un kit de estreptavidina biotina peroxidasa (Dako), con diaminobencidina como cromógeno.

Análisis estadístico: el estudio morfológico fue realizado bajo microscopio de luz (40 X) contando un total 300 células por grupo. (50 células x cada tubo x 6 tubos = 300 células por grupo) y determinado cuántas de ellas presentaban cambios morfológicos relacionados con el tamaño, citoplasma o tinción celular que tradujeran signos degenerativos indicativos de alteración o muerte celular. La muestra estuvo constituida por el % de células con morfología normal o alterada de cada grupo. La comparación de los grupos se realizó empleando el Test de Fisher (dos colas y el criterio de significancia de $P < 0,01$).

RESULTADOS

El estudio morfológico de las células endoteliales, bajo las diferentes condiciones de incubación planteadas en el diseño experimental, se muestra en la Tabla 2.

Tabla 1
Diseño Experimental

Cultivos endoteliales 6	LPS (micro L)	PRP rata control	PRP rata pretratada con ticlopidina	Solución de ticlopidina (micro L)	Volumen de medio (micro L)	Volumen final (micro L)
Grupo A control	—	—	—	—	450	450
Grupo B	200	—	—	—	250	450
Grupo C	200	200	—	—	50	450
Grupo D	200	—	200	—	50	450
Grupo E	200	200	—	50	—	450
Grupo F	—	200	—	—	250	450

[LPS] = 150 = µg / mL

[Scion de ticlopidina] = 60 mg/mL

[PRP] = 106 Plaquetas/dL

Tabla 2
Estudio morfológico de cultivos endoteliales bajo
diferentes condiciones de incubación

Grupo de cultivo	% de células con morfología	
	Normal	Alterada
A: control	93,3	6,7 (20 cél/300)
B: LPS	15,3	84,7 (246 cél/300)
C: LPS + PRP	7,3	92,7 (278 cel/300)
D: LPS + PRP-Tc	86,7	13,3 (40 cél/300)
E: LPS + STc	14,3	85,7 (257cél/300)
F: PRP	95,7	4,3 (13 cél/300)

LPS: Lipopolisacárido de *E. coli*, endotoxina. PRP: Plasma rico en plaquetas. PRP-Tc: plasma rico en plaquetas obtenido de ratas previamente tratadas con ticlopidina. STc: solución de ticlopidina, pH 7,4.

Los cultivos de células endoteliales del grupo A: control mostraron un 93,3 % de células con características normales de crecimiento, formas típicas poligonales, citoplasma abundante, homogéneo y núcleos grandes, ovalados con presencia de gránulos de cromatina (Figura 1). Estos cultivos contrastaron notablemente con aquellos sometidos a la acción directa de la LPS por una hora, (grupo B) en los cuales el 84,7 % de las células mostraron diverso grado de deterioro, ($P < 0,0001$) (Figura 2). El grado de daño celular se acentuó en presencia de plasma rico en plaquetas (Grupo C) donde el porcentaje de células alteradas se incrementó significativamente a un valor de 92,7 % ($P=0,0028$) llegando incluso a observarse células destruidas. Sin embargo, cuando el plasma rico en plaquetas que se colocaba, procedía de una rata pre-tratada con ticlopidina, (grupo D) los cultivos incubados en presencia de LPS mostraron sólo un 13,3 % de células alteradas (Figura 3) lo cual fue altamente significativo ($P < 0,0001$) cuando se le comparó al grupo C, aunque no llegó a ser similar al grupo control ($P < 0,0092$)

Los cultivos endoteliales en presencia de LPS y solución de ticlopidina (60 mg/mL) añadida directamente: (Grupo E), mostraron un grado de daño celular significativo en relación al grupo control ($P < 0,0001$) (Figura 4), pero no se diferenció estadísticamente ($P=0,8184$) del grupo sometido a LPS (Grupo B). La

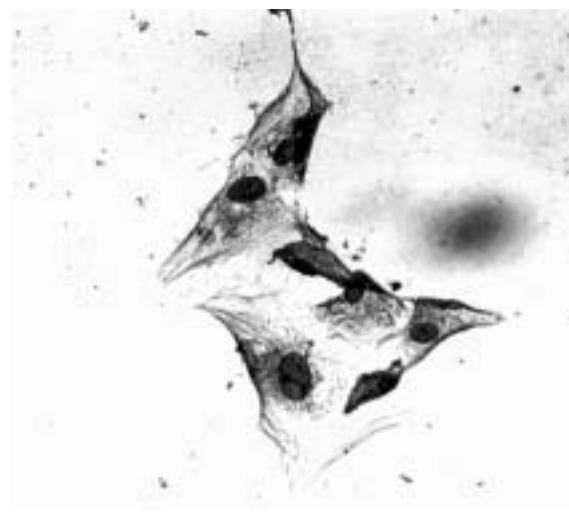
Figura 1

Muestra el cultivo de células endoteliales control. Como puede apreciarse la mayor parte de las células exhiben formas poligonales, citoplasma abundante y núcleo grande ovalado donde se aprecian gránulos de cromatina. (400x)



Figura 2

Muestra las células endoteliales luego de 1 hora de exposición con endotoxina de *E. coli* (LPS) a la dosis de 150 µg/mL. Puede apreciarse el deterioro celular, especialmente a nivel del citoplasma (400x)



incubación de los cultivos endoteliales en presencia de plasma rico en plaquetas de ratas controles mostró un % muy bajo de células alteradas similar a la de los controles, (Grupo F vs Grupo A) sin cambios significativos entre ambos grupos ($P=0,2825$).

Figura 3

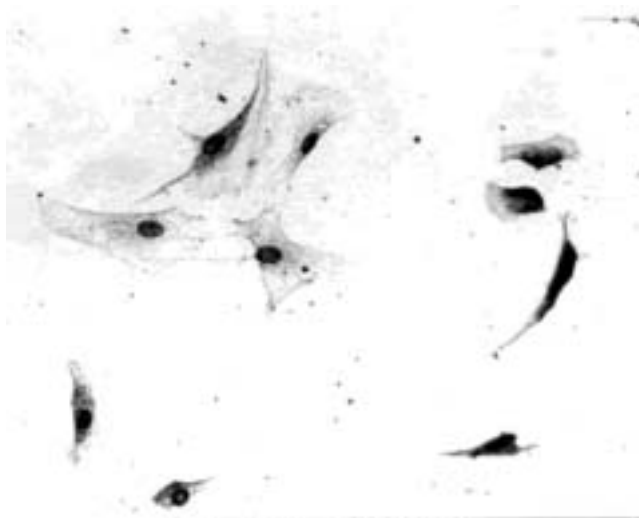
Representa el aspecto del endotelio luego de una hora de incubación con LPS y plaquetas provenientes de una rata pre tratada con ticlopidina. Destaca el aspecto de las células conservando todas sus características normales, similares a los controles (400x).



Figura 4

Muestra el aspecto de las células luego de 1 hora de incubación con LPS, más plaquetas procedentes de una rata control y solución de ticlopidina añadida directamente.

Como se aprecia las células muestran deterioro, con citoplasma poroso, vacuolización y cambios análogos a los observados en la Figura 2.



DISCUSIÓN

En el presente trabajo se exploró el efecto modulador de las plaquetas: normales o inhibidas con Tc, sobre las acciones de la LPS en cultivos de células endoteliales. Llama la atención las alteraciones celulares que se observan con tan sólo 1h de incubación en presencia de LPS, donde los citoplasmas presentaron aspecto acartonado, rígido, filamentososo y vacuolado. Estos cambios fueron más evidentes en presencia de plaquetas, encontrándose células totalmente dañadas. El daño directo de LPS sobre las células endoteliales en cultivo ha sido reportado por otros autores planteando que la endotoxina podría activar directamente (vía activación de la fosfolipasa A2) el metabolismo de los fosfolípidos de la membrana, alterando su estructura y modificando sus propiedades^(13,20). Se ha reportado además que las células endoteliales expuestas a LPS (vía receptores TLR-4) incrementan la producción de citokinas y otros factores, los cuales pueden mejorar la activación plaquetaria con liberación de agonistas que promuevan la trombogénesis endotelial⁽²¹⁾. Existen evidencias que señalan que la LPS es capaz de inducir la expresión de factor tisular en células endoteliales y monocitos⁽¹²⁾ siendo las plaquetas capaces de mejorar tal expresión^(13,14) y transformar un endotelio antitrombótico en una superficie altamente trombogénica con todas las consecuencias de un desbalance hemostático.

La observación más interesante de este trabajo fue, que en presencia de plaquetas provenientes de una rata pre-tratada con Tc, las alteraciones endoteliales provocadas por la LPS se redujeran significativamente, lo cual sugiere que el daño endotelial producido por la LPS puede en parte ser mediado a través de la activación plaquetaria e implicar receptores sensibles a agentes ténico piridínicos. Se conoce que el mecanismo de inhibición plaquetaria de la Tc es a través del bloqueo de su receptor de ADP, receptor purinérgico, conocido como P2Y₁₂ y a la subsecuente interferencia con la expresión de los receptores a fibrinógeno de la membrana; (glicoproteína IIb-IIIa)⁽¹⁵⁾. Es bien conocido que esta acción de la Tc no es directa, sino que requiere la formación de metabolitos hepáticos que se forman *in vivo* y que son los que verdaderamente inhiben al receptor⁽¹⁶⁾. Esta característica también se evidencia en este ensayo, pues la adición de solución de Tc directamente a los cultivos no fue capaz de protegerlos de la interacción LPS – plaqueta.

Se sabe que los receptores purinérgicos plaquetarios

P2Y₁₂ y P2Y₁ están implicados en la expresión de factor tisular tanto de leucocitos como de plaquetas⁽¹⁷⁾, y se ha reportado que Tc puede inhibir la expresión de este factor en células endoteliales en cultivo, sometidas a plaquetas estimuladas con LPS⁽¹⁸⁾. Estas evidencias junto a otras que sugieren que los receptores purinérgicos pueden modular la producción de mediadores inflamatorios inducida por endotoxina en macrófagos y otras células⁽¹⁹⁾ plantea que los antiagregantes tienopiridínicos dirigidos contra esta clase de receptores, tal como la ticlopidina y el clopidogrel podrían reducir fenómenos trombóticos inducidos por LPS. En conclusión: la ticlopidina, a través de su acción inhibidora de la agregación plaquetaria inducida por LPS, puede reducir la influencia de las interacciones LPS-Plaqueta sobre el endotelio, sugiriendo que este agente podría tener un potencial terapéutico en el shock séptico.

AGRADECIMIENTO: A Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la UCV por el financiamiento que hizo posible la realización de este trabajo. PI: 09-0055702004

REFERENCIAS

- Marik PE, Lipman J. The definition of septic shock: Implications for treatment. *Crit Care Resusc.* 2007;9:101-103.
- Raetz CRH. Bacterial lipopolysaccharides: A remarkable family of bioactive macroamphiphiles. En: *Escherichia Coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology*, edited by Niedhardt FC. Washington, DC: Am Soc Microbiol. 1996;p.1035-1057.
- Danner RL, Elin RJ, Hosseini JM, Wesley RA, Reily JM, Parrillo JE. Endotoxemia in human septic shock. *Chest.* 1991;99:169-176.
- Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein, *Science.* 1990;249:1431-1433.
- Miyake K. Endotoxin recognition molecules MD-2 and toll-like receptor 4 as potential targets for therapeutic intervention of endotoxin shock. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2004;3:291-297.
- Pugin J, Schurer-Maly CC, Leturcq D, Moriarty A, Ulevitch RJ, Tobias PS. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc Natl Acad Sci. EE.UU.* 1993;90:2744-2748.
- Benoît Vallet Bench-to-bedside review: Endothelial cell dysfunction in severe sepsis: A role in organ dysfunction? *Crit Care.* 2003;7:130-138.
- Mavrommatis AC, Theodoridis T, Orfanidou A, Roussos C, Christopoulou-Kokkinou V, Zakynthinos S. Coagulation system and platelets are fully activated in uncomplicated sepsis. *Crit Care Med.* 2000;28:585-586.
- Rumbaut RE, Bellera RV, Randhawa JK, Shrimpton CN, Dasgupta SK, Dong JF, Burns AR. Endotoxin enhances microvascular thrombosis in mouse cremaster venules via a TLR4-dependent, neutrophil-independent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;290:1671-1679.
- Martínez de Lima N, Pimentel de O. J. Efecto de la ticlopidina en la interacción endotoxina plaqueta y sus implicaciones en el shock endotóxico. *Arch Hosp Vargas.* 1997;39:177-183.
- Martínez de Lima N, Pimentel de O J. Efecto de la ticlopidina sobre las alteraciones hemostáticas precoces producidas por la endotoxina en ratas. *Arch Hosp Vargas.* 1997;39:185-190.
- Halvorsen H, Olsen JO, Osterud B. Granulocytes enhance LPS-induced tissue factor activity in monocytes via an interaction with platelets. *J Leukoc Biol.* 1993;54:275-282.
- Cheng J, Yuan J, Zheng J. The effect of lipopolysaccharide (LPS) on morphology and function of human umbilical endothelial cells. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi.* 2001;17:155-158.
- Amirkhosravi A, Alexander M, May K, Francis DA, Warnes G, Biggerstaff J, Francis JL. The importance of platelets in the expression of monocyte tissue factor antigen measured by a new whole blood flow cytometric assay. *Thromb Haemost.* 1996;75:87-95.
- Savi P, Labouret C, Delesque N, Guette F, Kupker J, Herbert JM. P2Y₁₂ a new platelet ADP receptor, target of clopidogrel. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;283:379-383.
- Yoneda K, Iwamura R, Kishi H, Mizukami Y, Mogami K, Kobayashi S. Identification of the active metabolite of ticlopidine from rat in vitro metabolites. *Br J Pharmacol.* 2004;142:551-557.
- Barnard MR, Linden MD, Frelinger AL 3rd, Li Y, Fox ML, Furman MI, et al. Effects of platelet binding on whole blood flow cytometry assays of monocytes and neutrophil procoagulant activity. *J Tromb Haemost.* 2005;3:2563-2570.
- Sarl P, Bernat A, Dumas A, Herbert JM. Effect of aspirin and clopidogrel of Platelet-dependent tissue factor expression in endothelial cells. *Thromb Res.* 1994;73:117-124.
- Guerra AN, Fiset PL, Pfeiffer ZA, Quinchia-Rios BH, Prabhu U, Aga M, et al. Purinergic receptor regulation of LPS-induced signaling and pathophysiology. *J Endotoxin Res.* 2003;9:256-263.
- Wang X, Cai SX, Wang XJ, Luo XD, Yang ZC. The mechanism of lipopolysaccharide infiltration through HUVEC membrane surface in direct endotoxin injury. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2005;44:211-222.
- Guessous F, Marcinkiewicz M, Polanowska-Grabowska R, Kongkhum S, Heatherly D, Obrigt T, Gear AR. Shiga toxin 2 and lipopolysaccharide induce human microvascular endothelial cells to release chemokines and factors that stimulate platelet function. *Infect Immun.* 2005;73:8306-8316.
- Guide for the care and use of laboratory animals US Department of Health and Human Services. NIH Publication N8623 revised, 1985.
- Gonder JC, Laber K. A renewed look at laboratory rodent housing and management. *ILAR J.* 2007;48:29-36.