# ABORATORIO OTOÑO 2020 / NÚMERO 87

sociedad española <sup>c</sup> para las ciencias del animal de laboratorio

Histología del intestino e hígado de peces de acuicultura. Comparación con pez cebra

Transmisión de caracteres genéticos



# At Envigo, the positives are in more than just our name

- + Global availability of high-quality research animal models
- + World-leading Teklad Global Diets® designed to minimize research variables
- Health and genetic testing, surgery, custom breeding and antibodies
- Transgenic models and services to advance disease research and drug development

Download our radiosensitivity of immunodeficient mice white paper at:

envigo.com/r2g2-cancer



## GRUPO EDITOR



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

www.secal.es

**DIRECTORA** 

Lara Sedó Cabezón

direccion.revista@secal.e

**SUBDIRECTORA** 

María Granada Picazo Martínez

direccion.revista@secal.es

**EDITORES DE ESTILO E IMAGEN** 

Olga Fernandez Rod

omfr/5@yahoo.es

Ruben Mota Bianco

ramota@externo.cnic.es

**PUBLICIDAD** 

David Mayo Lopez

FOTO DE PORTADA

Shutterstock

**DISEÑO Y MAQUETACIÓN** 

www.cervantes.agency

**IMPRIME** 

LPG

lpgtextil@gmail.com

**DEPÓSITO LEGAL** 

M-1362-1999

#### El último número de 2020

Comenzamos 2020 con nuevas ideas y proyectos para llevar a cabo a lo largo de este año en nuestra revista, pero la realidad de estos meses, ya largos, nos hizo recolocarnos en la casilla de salida nuevamente y jugar con las nuevas normas establecidas, dar prioridad a lo que ahora se podía realizar y dejar el resto para más adelante.

Pero gracias a la propia revista hemos podido seguir nuestro día a día, tal cual lo conocíamos. Hemos podido crear un número nuevo y más adelante recibir la revista en nuestros buzones o consultarla en la web, esto nos indicaba que todo estaba bien y que el trabajo continuaba.

El número 87, el último de 2020, completa el circulo de los cuatro números publicados este año, aportando a la biblioteca de la revista de la SECAL un amplio surtido de artículos que suman en calidad científica y divulgativa a todos los que ya tenemos. Casi todas las secciones han participado en esta revista por lo que en su interior encontraréis información muy variada en todos los ámbitos que la componen.

Hemos consolidado un fantástico equipo de responsables de sección que, junto con los editores de estilo e imagen, no han dejado de trabajar en ningún momento y siguen ilusionados por seguir haciéndolo, esperamos que continúe así por muchos números más.

¡Nos vemos en 2021, feliz lectura!

Dirección de la revista

## **EDITORIAL**

#### JUNTA DE GOBIERNO

#### **PRESIDENCIA**

Isabel Blanco Gutiérrez (2017-2021)

#### **SECRETARÍA**

Julia Samos Juárez (2017-2021)

#### TESORERÍA

Viviana Bisbal Velasco (2017-2021)

#### VOCALÍAS (2017-2021)

María Jesús Molina Cimadevila Elena Hevia Hernández David Mayo López John Sparrowe-Gil Del Real

#### VICEPRESIDENCIA

Juan Rodríguez Cuesta (2019-2023)

#### **VICESECRETARÍA**

Mónica Gómez-Juárez Sango (2019-2023)

#### **VICETESORERÍA**

Marta Miró Murillo (2019-2023)

#### VOCALÍAS (2019-2023)

Clara Sánchez González Oscar Pintado Sanjuán † Carlos Carnero Guerrero Garikoitz Azkona Mendoza

## SOCIOS BENEFACTORES



- ANADE
- ANIMALARIA FORMACIÓN y GESTIÓN, S.L.
- ANTONIO MATACHANA, S.A.
- ARP LOGÍSTICA CLÍNICA S.L.
- BIOGEN CIENTÍFICA, S.L.
- BIOSIS
- ► CENTRO DE ESTUDIOS BIOSANITARIOS, S.L.
- CHARLES RIVER LABORATORIES ESPAÑA, S.A.
- DINOX, S.L.
- DYNAMIMED, S.L.
- ENVIGO RMS SPAIN, S.L.
- GRANJA SAN BERNARDO
- IDEXX BIOANALYTICS
- JANVIER LABS

- NORAY BIOINFORMATICS, S.L.U.
- ▶ PANLAB HARVARD APPARATUS, S.L.U.
- PROLABOR
- ▶ RETTENMAIER IBERICA, S.L. Y CIA SCOM
- SODISPAN RESEARCH, S.L.
- STERILTECH, S.L.
- STERIS IBERIA, S.A.
- TEMINOX C.B.
- VESTILAB C.R.C., S.L.U.
- VIVOTECNIA RESEARCH
- ZOONLAB GmbH



www.secal.es



Directora

LARA

SEDÓ CABEZÓN

direccion.revista@secal.es



Subdirectora
MARÍA GRANADA
PICAZO MARTÍNEZ
direccion.revista@secal.es



Editora de estilo e imagen OLGA FERNÁNDEZ RODRÍGUEZ omfr75@yahoo.es



Editor de estilo e imagen **RUBÉN MOTA BLANCO** ramota@externo.cnic.es



Publicidad **DAVID MAYO LÓPEZ**publicidad.revista@secal.es

### **RESPONSABLES DE SECCIÓN**



Noticias SECAL/Actualidad SERGI VILA BELLMUNT sergivilab@gmail.com



Técnicas
ALEXANDRA
DE FRANCISCO LÓPEZ
afrancisco@hggm.es



Ética y legislación Seguridad en 5 minutos JESÚS MARTÍNEZ PALACIO jesus.martinez@ciemat.es



Al cuidado JULIA SÁNCHEZ GARCÍA julia.g.sanchez@gsk.com



¿Y tú qué opinas?/Un modelo al lado de los humanos JOSÉ LUIS MARTÍN BARRASA ilmbarrasa@qmail.com



Panorama
JAVIER
GUILLÉN IZCO
jguillen@AAALAC.org



Control sanitario JOSEP M³ MARIMON ESCUDÉ jmmarimon@ub.edu



Reproducción y genética MARTA CASADO PINNA mcasado@ibv.csic.es



Anestesia y analgesia JAVIER BENITO DE LA VÍBORA benedictusviper@hotmail.com



In vitro
GUILLERMO
REPETTO KUHN
grepkuh@upo.es



Bienestar animal GARIKOITZ AZKONA MENDOZA gazkona@gmail.com



CEEA-OH ALBERTO PASTOR CAMPOS albertopastor@umh.es



Tinciones y tejidos ANA ISABEL NIETO RUÍZ DE ZÁRATE anieto@ugr.es

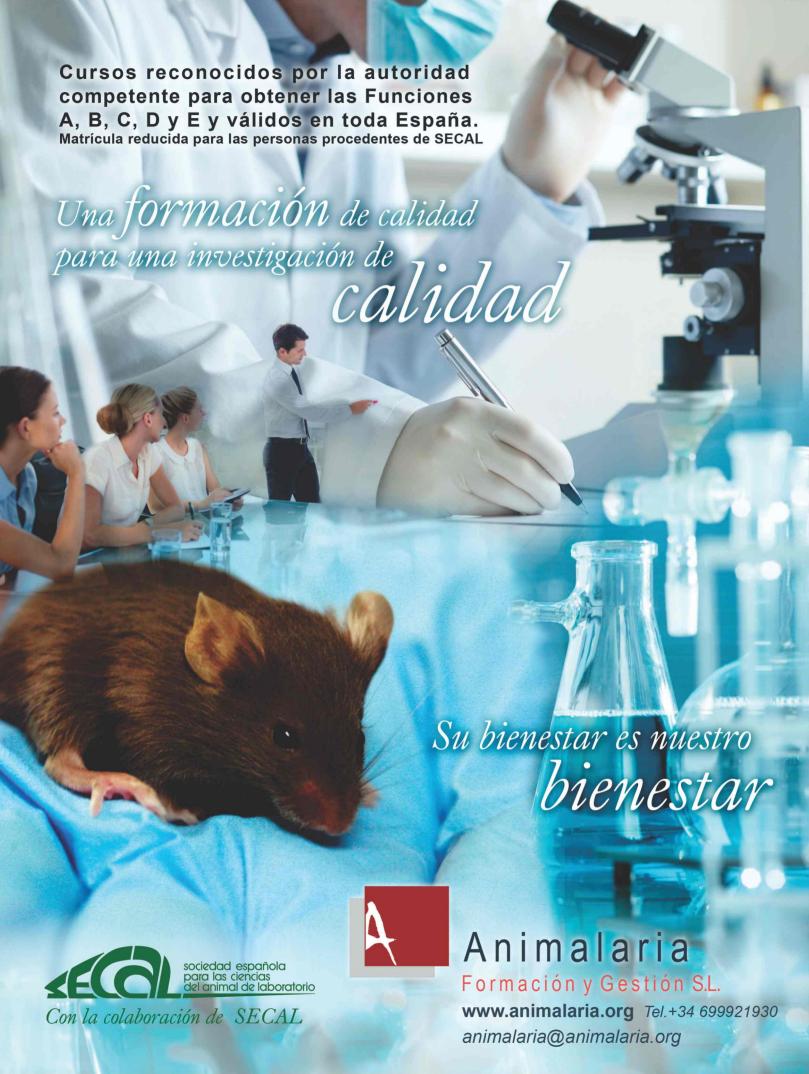


ABSLab
FRANCISCO JAVIER
GARCÍA PALOMO
jpalomo@usal.es



Indicios LOLA GARCÍA OLMO dgarcia@creballeida.org

Han colaborado en este número





#### **ANIMALES DE LABORATORIO**

OTOÑO 2020 / NÚMERO 87

#### 3 EDITORIAL

#### **8** NOTICIAS

- La SECAL en ExpoBioterios.
- De animal de laboratorio a mascota, una segunda vida es posible.
- Investigadores españoles publican una carta en Nature Methods para subrayar la necesidad de investigar con animales para obtener anticuerpos monoclonales.

#### 10 ACTUALIDAD

- Reproducen en ratones distintas etapas del sarcoma de Ewing.
- Prueban con éxito un tratamiento biológico para la degeneración de retina en modelos animales.
- Un estudio de la Universitat de Barcelona identifica una nueva diana farmacológica contra el Alzhéimer.
- La formación sobre bienestar animal crece entre las universidades europeas.
- El concepto One Health: una sola salud humana, animal y ambiental. La trinidad para afrontar futuras pandemias.

#### 16 TÉCNICAS

 Microburbujas. Explorando las posibilidades de la ecografía de contraste en el seguimiento del cáncer de páncreas.

#### 24 ÉTICAY LEGISLACIÓN

- La comisión nacional de Bienestar Animal.

#### 25 SEGURIDAD EN 5'

- ¿Cuánto gastan las empresas en prevención?

#### 27 ALCUIDADO

- Como gestionar una colonia de ratones.

#### 30 ¿Y TÚ, QUÉ OPINAS?

 Colitis por tóxico en ratón (DSS): Dextrano Sulfato Sódico Colitis por estrés en el Investigador (DSS): Demostrando que las Solución es Simple.

#### 34 REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA

- Transmisión de caracteres genéticos.

#### **44** ANESTESIAYANALGESIA

 Comparación de los efectos de dos protocolos de sedación en cerdos: tiletamina-zolacepam-xilacina versus ketamina-midazolam-xilacina.

#### 50 INVITRO

 Dispositivos microfluídicos como nueva herramienta de cultivo celular in vitro.

#### 52 BIENESTAR ANIMAL

 Estudio comparativo de tres materiales utilizados como lecho en cubetas de ratones de laboratorio.

#### 56 TINCIONES YTEJIDOS

- Histología del intestino e hígado de peces de acuicultura. Comparación con pez cebra.

#### 62 ABSLAB

 Mantenimiento de la actividad de RELY+ON™ VIRKON™ para la descontaminación de superficies de instalaciones de animales.

#### 70 INDICIOS

 Cómo hacer visible lo invisible: sistema de tarjetas.

### 73 UN MODELO AL LADO DE LOS HUMANOS

- Un poco de su sangre supone mucho avance en las técnicas diagnósticas de la encefalitis vírica del Nilo Occidental.



## NOTICIAS

### La SECAL en ExpoBioterios

Palabras clave: SECAL, congresos, virtual.

El 16 y 17 de octubre de 2020, se celebró ExpoBioterios, una experiencia virtual y avanzada centrada en la ciencia del animal de laboratorio. En este encuentro virtual participaron más de veinte ponentes que impartieron conferencias en áreas como bienestar animal, refinamiento, planes de contingencia en la era COVID-19, así como organización de animalarios/bioterios entre otros.

A su vez, este congreso fue un punto de encuentro para los profesionales de ambos continentes, en el que pudieron intercambiar opiniones los más de 1.300 asistentes.

La SECAL, *sponsor* oro, tuvo su *stand* en el Pabellón Amazonia, donde los miembros de la junta pudieron dar respuesta a las diversas preguntas realizadas por los asistentes en el chat.

Desde la SECAL queremos dar las gracias a todas las personas involucradas en la organización y gestión del congreso, y felicitarles por tan buen trabajo.

- ExpoBioterios: https://www.expobioteriosvirtual.com/



Figura 1.- Stand de la SECAL en la web de ExpoBioterios.

## De animal de laboratorio a mascota, una segunda vida es posible

Palabras clave: adopción, prensa, SECAL.

En este artículo, Isabel Blanco, presidenta de la Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL), y Javier Guillén, vocal de la Comisión de Estudio del Uso de Animales en Investigación Científica de la Confederación de Sociedades Científicas de España (COSCE), comentan como la legislación española y europea contempla que los animales utilizados en

experimentación biomédica puedan ser dados en adopción, realojados o devueltos a un hábitat, explotación u otro medio que sea adecuado para la especie de que se trate.

 Noticia completa: https://www.lavanguardia.com/natural/ fauna-flora/20201018/484101546186/animales-laboratorioexperimentacion-adopcion.html

# Investigadores españoles publican una carta en *Nature Methods* para subrayar la necesidad de investigar con animales para obtener anticuerpos monoclonales

Palabras clave: anticuerpos, métodos alternativos, COSCE.

El 15 de mayo, el EURL ECVAM's Scientific Advisory Committee publicó una recomendación para dejar de usar animales en el desarrollo de anticuerpos monoclonales asegurando que existía la tecnología alternativa equivalente sin utilizar animales, como por ejemplo el uso de librerías de virus bacteriófagos.

La primera reacción se produjo el 31 de mayo desde la Sociedad Española de Inmunología con un documento argumentando porqué la tecnología de obtención de hibridomas estodavía necesaria<sup>1</sup>.

Posteriormente, aparecieron otros artículos en *Nature Methods* y en *Nature* apoyando la recomendación y vinculados a empresas y grupos que fabrican anticuerpos monoclonales sin el uso de animales.

El 5 de octubre, *Nature Methods* publicó una carta<sup>2</sup> impulsada por la COSCE y firmada por varios científicos españoles: Margarita del Val y César Cobaleda (CBMSO-CSIC-UAM), Lluís Montoliu (CNB-CSIC), Kirk Leach (EARA), África González-Fernández y Marcos López Hoyos (SEI), y Javier Bermúdez (IBIMA) para subrayar la necesidad de investigar con modelos animales (ratones) en la obtención de anticuerpos monoclonales.

Los investigadores indican que están de acuerdo en reemplazar la experimentación animal por métodos alternativos cuando sea posible, pero la tecnología con librerías de virus bacteriófagos todavía tiene carencias y una especificidad y afinidad menor que los generados en modelos animales.

La técnica de generación de hibridomas sólo requiere animales durante la fase de inmunización, mientras que para la producción de anticuerpos ya no son necesarios.

- Sociedad Española de Inmunología: https://www.inmunología. org/images/site/noticias/1564.pdf
- González-Fernández A., Bermúdez F.J., López-Hoyos M., et al. Nonanimal-derived monoclonal antibodies are not ready to substitute current hybridoma technology. Nature Methods. 2020:17:1069-70.

**Información adicional:** Artículo de los investigadores de Regeneron, en el que reportan la producción de anticuerpos monoclonales bloqueantes del SARS-CoV-2 desarrollados en su ratón VelocImmune, usados en terapias experimentales para la COVID-19: https://science.sciencemag.org/content/369/6506/1010.long



## ACTUALIDAD

## Reproducen en ratones distintas etapas del sarcoma de Ewing

Palabras clave: avatares, sarcoma, enfermedad rara.

La investigadora Helena Castillo Écija del grupo liderado por Ángel Montero Carboso del Institut de Recerca de Sant Joan de Déu de Barcelona ha publicado los resultados de un estudio en ratones dónde reproduce varias etapas del sarcoma de Ewing para desvelar su resistencia a los tratamientos.

El sarcoma de Ewing es un tipo de sarcoma óseo o de tejidos blandos de células redondas pequeñas que afecta fundamentalmente a niños y jóvenes. Suele detectarse antes de los 20 años y en España se diagnostican unos 50 casos cada año.

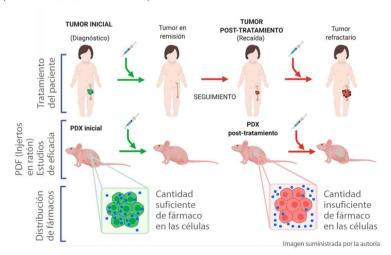
Cuando se detecta en estadios iniciales, este tipo de tumor suele responder bien a la quimioterapia, pero un elevado porcentaje de pacientes recae al cabo de un tiempo, y los tumores tardíos presentan más resistencia a los tratamientos.

El estudio de esta resistencia es lo que ha llevado a los investigadores a establecer parejas de avatares tumorales en diferentes fases de la enfermedad, y recolectar muestras del interior de los tumores a través de una microdiálisis para analizar el grado de permeabilidad de los fármacos.

Mientras que el fármaco consigue acceder al interior de las células cancerígenas en la etapa inicial del tumor, en la etapa de recaída algunos tumores generan un escudo (la glicoproteína P) que impermeabiliza la célula tumoral.

El principal reto de este estudio, publicado en la revista *Journal* of *Controlled Release*, fue generar los ratones avatares de los tumores de los pacientes (ver Figura 1), ya que sólo uno de cada tres tumores se consigue injertar con éxito. La capacidad de analizar *in situ* la permeabilidad del fármaco al interior de la célula cancerígena permitirá en el futuro traducirse en una aplicación clínica a través de nuevos tratamientos que mejoren la penetración del medicamento en los tumores.

- Nota de prensa del Institut de Recerca Sant Joan de Déu: https://www.irsjd.org/es/actualidad/noticias/744/reproducenen-ratones-distintas-etapas-del-sarcoma-de-ewing
- Artículo de referencia: Castillo-Ecija H., Monterrubio C., Pascual-Pasto G., et al. Treatment-driven selection of chemoresistant Ewing sarcoma tumors with limited drug distribution. J Control Release. 2020;324:440-9.



**Figura 1.-** Proceso de creación de los avatares tumorales en ratones aplicado al sarcoma de Ewing.



OTOÑO 2020 / NÚMERO 87



## Prueban con éxito un tratamiento biológico para la degeneración de retina en modelos animales

Palabras clave: retina, enfermedad rara, antiinflamatorio.

La retinosis pigmentaria (RP) es un conjunto de distrofias de la retina de origen genético, caracterizada por la pérdida progresiva e irreversible de la visión. Aunque se considera una enfermedad rara, es la principal causa genética de ceguera en países desarrollados (ver Figura 1), conociéndose mutaciones en más de 100 genes de las diferentes formas de RP.

En España, según la Federación de Asociaciones de Distrofias Hereditarias de Retina de España (FARPE), hay 1,8-2 millones de personas afectadas por enfermedades degenerativas de la retina. La RP afecta aproximadamente a unas 20.000 personas en nuestro país.

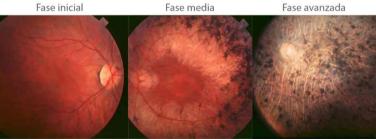


Imagen suministrada por la aut

Figura 1.- Fases de la progresión de la retinosis pigmentaria en humanos. Christian Hamel. *Retinitis pigmentosa*. Orphanet Journal of Rare Diseases. 2006. Licencia CC 2.0.

El equipo liderado por la investigadora Regina Rodrigo del Centro de Investigación Príncipe Felipe junto al grupo CIBERER coordinado por José María Millán del Hospital Universitario la Fe de Valencia han presentado un nuevo tratamiento para retrasar la degeneración de la retina disminuyendo la inflamación con Adalimumab en ratones con RP.

El Adalimumab es un antiinflamatorio dirigido contra la molécula proinflamatoria TNFα. Se utiliza en la práctica clínica para el tratamiento de enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, la artritis psoriásica, la psoriasis o la uveítis. Su administración es subcutánea y disminuye los síntomas inflamatorios.

El grupo de Regina Rodrigo ya había realizado estudios previos con este antiinflamatorio en modelos animales. Habían utilizado el ratón rd10 (B6.CXB1-Pde6brd10) como modelo de RP autosómica recesiva con administración intraperitoneal del medicamento. El fármaco había demostrado su efecto neuroprotector, pero eran necesarias varias inyecciones y el efecto acababa desapareciendo en el tiempo.

La novedad en este estudio publicado en *The FASEB Journal* (revista de la Federación de Sociedades Americanas de Biología Experimental) es la administración intravítrea de Adalimumab – también en el modelo murino rd10 – y en dosis única. De esta manera se han reducido posibles efectos secundarios de una administración sistémica y se ha prolongado el efecto protector.

- Nota de prensa del CIBERER: https://www.ciberer.es/ noticias/prueban-con-exito-un-tratamiento-biologico-para-ladegeneracion-de-retina-en-modelos-animales
- Artículo de referencia: Olivares-Gonzalez L., Velasco S., Millán Jose María M., et al. Intravitreal administration of adalimumab delays ratinal degeneration in rd10 mice. The FASEB Journal. 2020;34:10.



## Un estudio de la Universitat de Barcelona identifica una nueva diana farmacológica contra el Alzhéimer

Palabras clave: Alzhéimer, inflamación, terapia.

Los fármacos que se conocen actualmente para tratar el Alzhéimer tienen una eficacia muy limitada y sólo en estadios iniciales de la enfermedad.

Las estrategias terapéuticas se han centrado sobre todo en contrarrestar la acumulación y la formación de placas de proteína beta-amiloide en el cerebro. Este estudio plantea un nuevo enfoque a través de los procesos inflamatorios que contribuyen a desencadenar esta enfermedad y modular su patogénesis. Los resultados muestran que la inhibición de la enzima epóxido hidrolada soluble (sEH) en modelos murinos disminuye el proceso neuroinflamatorio.

Este estudio se ha publicado en la revista Neurotherapeutics y ha sido liderado por los profesores de la Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación Mercè Pallàs (Institut de Neurociències de la Universitat de Barcelona), Santiago Vázquez (Institut de Biomedicina de la UB, IBUB), Carles Galdeano (IBUB) y Christian Griñán-Ferré (Institut de Neurociències de la UB), junto con la colaboración de expertos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBB), la Universitat Autònoma de Barcelona, la Universidad de Santiago de Compostela y la Universidad de California-Davis.

La enzima sEH está presente en todo el organismo y es relativamente abundante en el cerebro murino y humano. Esto permitió a los investigadores analizar los efectos de la inhibición de la sEH en dos modelos animales de Alzhéimer: uno considerado de Alzhéimer familiar y otro ligado a la progresión de la enfermedad con la edad avanzada.

La inhibición de la sEH puede tener implicaciones en el tratamiento de otras patologías con un componente inflamatorio importante, como la de Niemann-Pick de tipo C, el dolor neuropático o la pancreatitis aguda.

- Nota de prensa de la Universitat de Barcelona: https://www.ub.edu/web/ub/es/menu\_eines/noticies/2020/07/042. html#.Xxxsi35gV8M.twitter
- Artículo de referencia: Griñán-Ferré C., Codony S., Pujol E., et al. Pharmacological inhibition of soluble epoxide hydrolase as a new therapy for Alzheimer's disease. Neurotherapeutics. 2020.

## La formación sobre bienestar animal crece entre las universidades europeas

Palabras clave: bienestar animal, veterinaria, universidad.

El concepto de bienestar animal es fundamental para el buen desarrollo de la actividad veterinaria y conlleva una serie de dimensiones científicas, éticas y legales que hay que tener muy presentes. Por ello, es de suma importancia que los estudiantes y futuros profesionales reciban durante sus estudios una buena educación en este ámbito, además de entender cómo esto puede influir en otras áreas de su trabajo.

Con el objetivo de evaluar las enseñanzas sobre ciencias de bienestar animal, ética y derecho en las universidades europeas veterinarias, la Federación de Veterinarios de Europa (FVE) con la colaboración de la Universidad de Novi Sad de Serbia, la Universidad de Birmingham de Reino Unido y la Universidad de Lisboa en Portugal han llevado a cabo una encuesta para analizar la evolución del progreso de la enseñanza AWSEL (*Animal Welfare Science, Ethics and Law*, en inglés) durante el periodo 2012-2019.



#### **ANIMALES DE LABORATORIO**

OTOÑO 2020 / NÚMERO 87

La encuesta revela que las enseñanzas sobre bienestar, ética y derecho animal han aumentado en los últimos 7 años sustancialmente en las universidades europeas respecto al último informe realizado en 2012.

 Artículo completo en Diario Veterinario: https://www. diarioveterinario.com/t/2073393/formacion-sobre-bienestaranimal-crece-entre-universidades-europeas

### El concepto *One Health*: una sola salud humana, animal y ambiental. La trinidad para afrontar futuras pandemias

Palabras clave: veterinaria, COVID-19, zoonosis.

El nuevo coronavirus ha surgido en el mundo de la superpoblación, la globalización y la emergencia climática. La magnitud de la pandemia ha reflejado las conexiones que existen entre las personas, los demás seres vivos y su entorno, tanto a escala local como global. Este artículo de Núria Jar, publicado por la Agencia SINC, es una síntesis de todo lo que se ha publicado y discutido, abordando la complejidad de la crisis a través de unir las diferentes realidades en un solo concepto.

El concepto *One Health* (Una sola Salud) fue introducido a comienzos de la década del 2000, una noción conocida desde hace más de un siglo, en la que la salud humana y la sanidad animal son interdependientes y están vinculadas a los ecosistemas en los cuales coexisten (ver Figura 1). La veterinaria es, por tanto, la profesión de referencia para uno de estos pilares.



Imagen suministrada por la autoría

**Figura 1.-** Infografía sobre el concepto *One Health*. Licencia CC 4.0 Agencia SINC/CDC.

One Health es un enfoque concebido para diseñar y aplicar programas, políticas, leyes e investigaciones en los que múltiples sectores se comunican y colaboran para lograr mejores resultados de salud pública. Desde 2016, el 3 de noviembre se celebra el día internacional One Health para concienciar a la sociedad de este enfoque.

En cuanto a las zoonosis, según datos de la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal, conocida originalmente como Oficina Internacional d'Epizoòties) y la OMS (Organización Mundial de la Salud), un 60% de las enfermedades infecciosas humanas conocidas y un 75% de las enfermedades humanas emergentes son de origen animal, al igual que el 80% de los agentes patógenos susceptibles de ser utilizados por el bioterrorismo.

A pesar de la importancia de la labor veterinaria en la prevención de enfermedades, los profesionales de la salud animal no están reconocidos como una profesión sanitaria a todos los efectos; ya que, por ejemplo, las clínicas no son consideradas como centros sanitarios y se aplica un IVA del 21% a la vacunación de enfermedades zoonóticas como la rabia. Algo parecido ocurre con las labores de los veterinarios encargados de velar por otros aspectos de la salud pública como la seguridad alimentaria; los cuáles están dispersos por ministerios, consejerías e incluso ayuntamientos, lo que entorpece su trabajo.

Por esto, distintas voces han defendido que los veterinarios de salud pública trabajen coordinados al amparo del Sistema Nacional de Salud o por lo menos, de las consejerías de Salud. Un ejemplo ha sido la reclamación del Consejo General de

## ACTUALIDAD

Colegios de Veterinarios, lamentando que el Gobierno y varias administraciones no hayan contado en la crisis del coronavirus con el colectivo más experto en pandemias y enfermedades zoonóticas, pese al firme compromiso, profesionalidad y solidaridad durante el estado de alarma demostrado por sus profesionales.

En España, el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) ha creado la plataforma Salud Global, coordinada por la viróloga Margarita del Val, que agrupa a unos 300 grupos de investigación de toda la geografía española trabajando en unos 60 proyectos multidisciplinares.

Durante estos meses, se puede visitar la exposición temporal en el Museo de Ciencias Naturales de Barcelona *Outbreak*. *Epidemias en un mundo conectado*. Es una muestra que forma parte de un proyecto creado por el Museo de Historia Natural Smithsonian (Washington DC), con el objetivo de concienciar sobre los factores humanos, animales y ambientales que contribuyen a las epidemias por enfermedades infecciosas en un mundo globalizado y conectado. Es posible realizar un tour virtual en este enlace: https://naturalhistory2.si.edu/vt3/misc/z\_tour-m006.html.

- Artículo completo en SINC: https://www.agenciasinc.es/ Reportajes/La-trinidad-para-afrontar-futuras-pandemias-una-solasalud-humana-animal-y-ambiental
- Web de los CDC sobre One Health: https://www.cdc.gov/ onehealth/index.html

### HAZTE SOCIO BENEFACTOR

TU EMPRESA TAMBIÉN PUEDE SER PARTE DE LA SECAL



Estamos en el centro de la investigación en habla hispana





New Zealand White Rabbit.

Total absence of all important rabbit disease germens with specific sanitary garantees.

Ask our most recent garantee table at www.granjasanbernardo.com



### Microburbujas. Explorando las posibilidades de la ecografía de contraste en el seguimiento del cáncer de páncreas

Guillermo Medrano, Guillermo Garaulet, Sergio Mateos, Gloria Visdómine, Silvia Leal, Tatiana Álvarez y Francisca Mulero

Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) – Madrid

Palabras clave: ecografía, ratón, microburbujas.

#### INTRODUCCIÓN

La ecografía de contraste complementa a la ecografía tradicional permitiendo la observación y cuantificación del flujo sanguíneo y de la perfusión en el organismo hasta el nivel capilar. Por lo tanto, esta técnica hace posible el estudio de la microvascularización, revelando las diferencias existentes entre tejidos sanos y patológicos, en tiempo real y de una forma no invasiva<sup>1</sup>. Los agentes de contraste disponibles en el mercado son las llamadas microburbujas de gas que se administran por vía intravenosa. Estas microburbujas están compuestas por una capa lipídica que encierra un gas en su interior ( $C_4F_{10}/N_2$ ), el cual tiene un alto grado de ecogenicidad, es decir, alta capacidad de reflejar las ondas de ultrasonido. Esta característica es la que produce un alto contraste con respecto a los tejidos adyacentes, dando como resultado imágenes con realce de la vascularización. La monitorización del cambio de intensidad de la señal ecogénica en la imagen tras la inyección del contraste permite su cuantificación relativa. Además, mediante pulsos de ultrasonidos de alta frecuencia es posible destruir las microburbujas permitiendo la cuantificación absoluta de la perfusión en un plano y momento concretos.

De este modo, la ecografía de contraste representa una herramienta muy útil para el estudio de diversas patologías, tanto en la clínica veterinaria², como en modelos preclínicos murinos³, permitiendo estudiar el flujo sanguíneo en el corazón y otros órganos, identificar zonas isquémicas, infartadas o necróticas, o, por ejemplo, en oncología, obtener y cuantificar imágenes de la neoangiogénesis tumoral.

Hay todo un nuevo campo de posibilidades experimentales en el desarrollo de microburbujas dirigidas a dianas concretas conjugando ligandos específicos en la superficie de las mismas<sup>4</sup>, como por ejemplo aquellas dirigidas contra biomarcadores de angiogénesis. De entre ellas, la estrategia más prometedora hasta el momento es la unión al receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2 (VEFGR2)<sup>5</sup>, que abre una puerta a esta técnica para usarse como herramienta de diagnóstico en la evaluación de tumores y la monitorización de las terapias<sup>67</sup>.

Una característica importante de la ecografía con contraste es que es segura para los animales de experimentación, comparable a la seguridad de los agentes de contraste en MRI, y más segura que los agentes de contraste metálico utilizados en tomografía computarizada (CT).

El objetivo de este artículo es la descripción del protocolo necesario para realizar imagen ecográfica de contraste en ratón, para el diagnóstico y seguimiento de ratones genéticamente modificados que desarrollan adenocarcinoma ductal pancreático.

En la descripción del protocolo se incluye la preparación del contraste, la inyección del agente (bolo), la adquisición de las imágenes ecográficas de la región donde se localiza el tumor, el posterior análisis de los datos, así como la optimización postproceso de la imagen.

#### **MATERIAL Y MÉTODOS**

Para la realización de este protocolo se han utilizado:

Ecógrafo Vevo® 3100 Fujifilm VisualSonics, Toronto, Canadá.
 Sistema de imagen de alta resolución por ecografía específico



OTOÑO 2020 / NÚMERO 87



para animal de laboratorio pequeño con el modo de contraste no lineal disponible y un transductor del modelo MX250 (15-30 MHz). Los accesorios necesarios para utilizar el ecógrafo incluyen una cama calefactada con sistema de monitorización en tiempo real de los parámetros fisiológicos críticos: temperatura corporal, frecuencia cardiaca y respiratoria, además de un brazo motorizado unido a un raíl para sujetar el transductor en el punto fijo deseado. Esta completa estación de imagen se conecta a un equipo de anestesia con vaporizador de isoflurano que trabaja con un concentrador de oxígeno (ver Figura 1).



**Figura 1.- A.** Vevo® 3100. **B.** Estación de imagen con plataforma para ratón. **C.** Sistema de anestesia.

2. Agente de contraste: Vevo MicroMarker™ Non-Targeted Contrast Agent desarrollado por BRACCO Research SA. Como su nombre indica, se trata de un contraste no dirigido a una diana anatómica específica. El vial sin reconstituir se guarda a 4°C y tiene una caducidad de 12 meses.

Son microburbujas liofilizadas con una envoltura lipídica que encierra un agente activo gaseoso en su interior. El gas que determina la ecogenicidad de la microburbuja es una mezcla de perfluorobutano y nitrógeno, gases de alta densidad, inertes e incoloros. Los gases pesados son más insolubles en agua lo que hace más estables las microburbujas, prolongando su vida media en circulación<sup>8</sup>.

Las microburbujas se transforman en agentes llenos de gas una vez se ha reconstituido el vial con suero salino (ver Figura 2).

La naturaleza de la envoltura también determina la longevidad del agente de contraste en circulación pues cuanto más hidrofílica sea, mayor es la facilidad con la que el sistema inmune las capta<sup>9</sup>. El diámetro medio de estas microburbujas oscila entre los 2,3 y los 2,9 µm (menos de la mitad de lo que mide un eritrocito) lo que facilita su paso por la microvascularización.

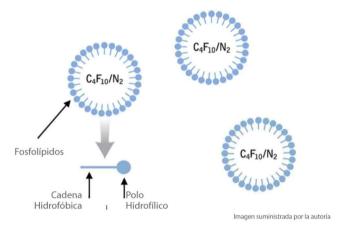


Figura 2.- Esquema de la composición de las microburbujas reconstituidas.

3. Material para la preparación del agente y su inyección en forma de bolo: suero salino, jeringuillas de 1 ml y agujas de calibre 21G, palomilla de infusión de calibre 27G, adhesivo tisular. La inoculación del agente de contraste será siempre vascular, a través de la vena de la cola, la vena yugular o el seno retro-orbital. Se prefiere una técnica de canulación para evitar el movimiento del sujeto durante la imagen. En este estudio utilizaremos la vena de la cola como vía recomendada.

#### **PROCEDIMIENTO**

#### Preparación del agente de contraste

Siempre debemos seguir las instrucciones dadas por el fabricante para la reconstitución del agente. La concentración de microburbujas a usar dependerá de la diana anatómica que queramos analizar en el ratón.

En el caso del agente de contraste no dirigido Vevo MicroMarker® (ver Figura 3), el producto viene en un vial para ser reconstituido con 0,7 ml de suero salino obteniendo una concentración de 2x109 microburbujas/ml.

## **TÉCNICAS**



inagen sammatada por la

Figura 3.- Agente de contraste no dirigido Vevo MicroMarker®.

En nuestro caso, siendo la diana anatómica un tumor, se recomienda una concentración de  $1x10^8$  microburbujas/50  $\mu$ l. Usaremos para la reconstitución la aguja de 21G, una vez inyectado el salino quitamos la jeringuilla, dejamos la aguja en el vial durante unos pocos segundos para ventilar, la retiramos y agitamos muy suavemente el vial durante un minuto. Finalmente, lo dejamos reposar durante diez minutos a temperatura ambiente. El bolo a inyectar en nuestro caso será de 50  $\mu$ l (1,0  $\times$  10 microburbujas), agitamos muy suavemente todo el contenido del vial y usamos una jerinquilla de 1 ml con aguja de 21G.

Es importante recalcar que el bolo se debe preparar cuando esté todo listo para la adquisición de la imagen, para evitar la desestabilización de las microburbujas con el tiempo de espera. Cualquier contraste reconstituido debe descartarse si no se usa en esa misma sesión, pues entre las 4 y 6 horas se habrá desestabilizado completamente.

#### Preparación del animal para la inyección

La manipulación y preparación del animal para el estudio seguirá siempre las recomendaciones de FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Associations*) y todos los procedimientos deberán estar previamente revisados y aprobados por el comité ético de la institución.

Primero se dormirá al animal con el procedimiento habitual para realizar una ecografía de páncreas, la inducción se hará con oxígeno a 0,5 ml/min y 4% de isoflurano y el mantenimiento será con oxígeno a 0,5 ml/min y 2% de anestésico. Dependiendo de la cepa, edad y otras características de los ratones, estos parámetros pueden modificarse para conseguir un plano anestésico seguro y estable en el que el animal no se mueva durante el estudio. La

cama la mantendremos a 37°C para evitar la hipotermia y cubriremos los ojos del ratón con gel oftálmico para proteger la córnea durante todo el procedimiento.

El animal se colocará en la superficie en decúbito supino con el hocico dentro del tubo de anestesia, las extremidades fijadas a los electrodos de la cama con pequeños trozos de cinta adhesiva quedando el animal en posición de "X" (ver Figura 4), siempre con cuidado de no forzar las extremidades y articulaciones. Los electrodos deben humedecerse previamente con gel electroconductor para facilitar la trasmisión de la señal. La sonda de temperatura rectal debe introducirse suavemente y lubricarse con vaselina.

De esta forma tendremos las constantes del animal completamente monitorizadas durante todo el procedimiento.

El pelo del animal en la zona a estudiar es un obstáculo, debemos eliminarlo por completo utilizando una pequeña rasuradora eléctrica y crema depilatoria. Esta última no debe dejarse actuar más de un minuto o dañará la piel del animal. Se limpiará bien la zona con una gasa o papel absorbente humedecido una vez haya actuado la crema, retirando los restos de crema depilatoria por completo.



Figura 4.- Ratón en la plataforma con vía intravenosa en cola.

La inyección intravenosa en la cola de los ratones requiere de material adecuado y un usuario con experiencia para tener éxito. La vía habitual para inoculaciones intravenosas en ratón es una de





las dos venas laterales de la cola. La aguja de la palomilla debe tener un calibre lo suficientemente pequeño para quedar dentro del vaso y no romperlo. La palomilla irá conectada a una jeringuilla con suero para inyectar un poco y comprobar que la vía está bien tomada, luego la sustituiremos por la que contiene el bolo a inyectar.

Para introducir la aguja, primero dilatamos las venas de la cola exponiendo al animal a una lámpara de calor mientras está dormido y posicionado en la cama de anestesia. Colocamos la luz de calor a una distancia prudencial del animal comprobando la temperatura poniendo nuestra propia mano bajo la luz. Una vez dilatadas las venas de la cola, podemos pasar una gasa ligeramente humedecida en alcohol al 70% por la cola para aumentar la vasodilatación, consiguiendo que los vasos venosos sean más visibles.

La aguja debe introducirse suave y paralelamente a la vena con el menor ángulo de entrada posible para no traspasarla, con el bisel siempre hacia arriba. La aguja entrará en la vena solamente unos pocos milímetros. Pulsaremos el émbolo de la jeringuilla para introducir suero en la vena y si este se desliza suavemente sin oponer resistencia, habremos tenido éxito. Si opone resistencia y presionamos, el suero se extravasará formando un abultamiento bajo la piel, impidiendo la visión de la vena en esa zona. Por ello es recomendable no forzar el émbolo, si estamos dentro de la vena apenas habrá que hacer presión para pulsarlo. En caso de fallar en la colocación de la vía, repetiremos el proceso en una parte de la vena más craneal a la del primer intento y así sucesivamente si hubiera que repetir el procedimiento.

Una vez estemos seguros de que la vía está bien puesta, fijamos la aguja de la palomilla a la cola con pegamento tisular para evitar que se salga o mueva. Ahora podemos conectar a la vía la jeringuilla que contiene el contraste, cuando tengamos todo preparado en el equipo para adquirir las imágenes ecográficas.

Los agentes de contraste tienden a formar una fase, por lo que las microburbujas pueden flotar y acumularse en la parte superior de la jeringuilla. Una suave agitación a mano puede ayudar a mantener las microburbujas suspendidas en la solución para la infusión.

#### Obtención de la imagen

Aplicamos gel ecográfico atemperado previamente en un calentador de botellas sobre el vientre del animal, de forma uniforme y evitando que contenga burbujas en su interior para

optimizar la transducción de los ultrasonidos y no tener artefactos en la imagen.

Realizaremos la exploración del páncreas del animal en busca del tumor que en este caso suelen ser masas esferoides, algunas veces de naturaleza quística con contenido líquido. Su aspecto es diferente al del resto del páncreas por diferencia de ecogenicidad, normalmente se verán más oscuros (hipoecogénicos) que el páncreas sano. No presentan un patrón ecográfico específico y se diagnostican por su ubicación, ya que es difícil confirmar ecográficamente una unión con el parénquima pancreático¹º. La identificación de tumores pancreáticos se complica aún más si hay inflamación, la pancreatitis aguda se muestra como focos hipoecogénicos que corresponden a zonas de edema e inflamación y en la crónica aparecen zonas hiperecogénicas debido a la fibrosis o presencia de calcificaciones.

Para localizar el páncreas colocamos la sonda en posición transversal en la zona más craneal del abdomen y hacemos lentos barridos de arriba abajo y de izquierda a derecha recorriendo el vientre del animal. El páncreas en los ratones es un órgano difuso que aparece en la zona media y alta del abdomen muy próximo a otros órganos; lo observaremos caudal al hígado, rodeando a los riñones, junto al bazo, posterior al estómago, etc. Es una estructura de márgenes poco definidos e hiperecogénica con respecto a la corteza renal y al hígado (ver Figura 5).

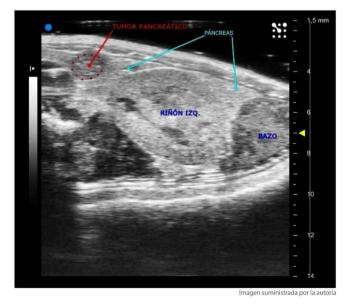


Figura 5.- Imagen ecográfica abdominal de un ratón transgénico con adenocarcinoma ductal de páncreas.

## **TÉCNICAS**

Esta distribución y su ecogenicidad similar a la de la grasa mesentérica adyacente complica su exploración ecográfica. Además, parte del páncreas puede estar oculto tras el duodeno y el estómago que suelen tener un alto contenido en gas<sup>11</sup>.

Una vez localizado el tumor lo observaremos con la sonda tanto en corte transversal como longitudinal para comprobar su magnitud tridimensional.

Dejamos el transductor estático y sujeto en el brazo mecánico manteniendo una pequeña cantidad de gel entre el transductor y el animal mostrando en el monitor el plano de corte con la imagen del tumor que vamos a analizar. A continuación, iniciaremos una adquisición de video (15-20 frames por segundo) en modo de contraste no lineal para poder ver la llegada y entrada del agente al tumor tras la inoculación del bolo. Inyectamos el contraste despacio durante 5 segundos manteniendo la jeringuilla en la cánula que conecta con la aguja de palomilla hasta que todo el video haya sido adquirido y grabado (ver Figura 6). Es aconsejable una vez hemos terminado la adquisición de imágenes, lavar la vía intravenosa inyectando entre 20 y 30 µl de suero salino estéril.

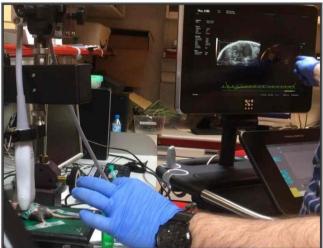


Imagen suministrada por la autoría

Figura 6.- Inyección del contraste y adquisición de las imágenes.

El número de adquisiciones está limitado por el volumen máximo de fluido que se le puede administrar al animal durante una sesión, que está condicionado a su vez por la edad y peso del animal. Siempre que tengamos dudas al respecto habrá que consultar las especificaciones del protocolo que se ha aprobado.

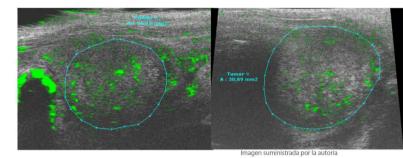
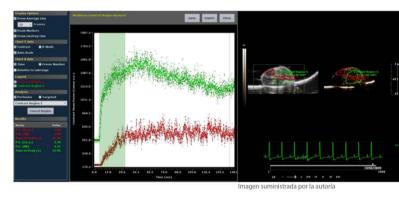


Figura 7.- Perfusión del tumor por inyección del agente de contraste. A la izquierda tumor muy vascularizado, a la derecha tumor poco vascularizado.

#### Análisis de las imágenes obtenidas y postprocesado

En nuestro estudio podemos individualizar la estructura donde queremos cuantificar la cantidad de contraste que ha llegado revelando el grado de microvascularización del tumor (ver Figura 7). Todo el procedimiento de llegada y distribución del contraste se graba en video para poder reproducir en el seguimiento longitudinal los mismos parámetros y posicionamiento y así poder comparar los cambios en la vascularización de ese tumor, por ejemplo, tras un tratamiento con agentes antiangiogénicos (ver Figura 8).



**Figura 8.-** Análisis comparativo de intensidad de contraste en dos zonas distintas del tumor con el software Vevo LAB.

Las variables cuantificables en este tipo de estudios con contraste son:

 Peak Enhancement (PE), se muestra en db (unidad) y en unidades arbitrarias (a.u.): es la relación entre el valor en la meseta y el valor de contraste basal y se traduce en una medida del volumen sanguíneo relativo.



OTOÑO 2020 / NÚMERO 87



- *Time to Peak:* es la cantidad de tiempo que tarda la intensidad de contraste en alcanzar el valor de meseta. Esta es una medida de la velocidad relativa de la sangre.

Para realizar estudios comparativos en el tiempo en el mismo sujeto y comparar entre un sujeto tratado y uno control podemos utilizar esta cifra de cambio de intensidad que se puede correlacionar con la cantidad de contraste que hay dentro del tumor y que es equivalente a la microvascularización generada o destruida dentro del tumor (ver Figura 9).

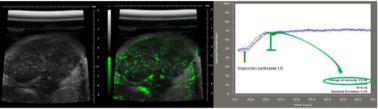


Imagen suministrada por la autor

**Figura 9.-** Imagen de un tumor antes de inyectar el contraste y tras la inyección, a la derecha se observa la gráfica donde se representa el incremento de intensidad que aparece tras el contraste.

#### **VENTAJAS E INCONVENIENTES**

La ventaja fundamental de la ecografía de contraste es que nos facilita diferenciar el grado de vascularización en tiempo real *in vivo*, de forma no invasiva. En especial, podemos obtener información cuantificable de los vasos más pequeños cuyo estudio no es posible con una ecografía de efecto Doppler, la cual necesita un calibre de vasos mucho más grandes que los existentes en un tumor. Por tanto, en el campo de la oncología es una herramienta de gran utilidad para monitorizar los procesos de neoangiogénesis asociados al crecimiento tumoral y para hacer el seguimiento de terapias anti-angiogénicas en modelos experimentales. En el caso de los tumores pancreáticos es una herramienta muy útil pues se caracterizan por una alta densidad de microvascularización muy deteriorada y con pobre perfusión distribuida de manera heterogénea<sup>12</sup>, lo que dificulta su observación con otros métodos.

Con respecto a otras técnicas de imagen, es una técnica con bajo coste y lo más importante para el bienestar animal, segura.

Por otra parte, no es un procedimiento libre de inconvenientes. A nivel práctico, es una técnica que requiere bastante tiempo para su realización y análisis, más si el estudio consta de muchos animales con varios tumores cada uno. La corta

vida de las microburbujas en circulación (el tiempo de lavado completo es de 15-20 minutos en ratones) no deja mucho margen de error y además la complejidad a nivel técnico requiere de personal con mucha experiencia tanto en ecografía como en manejo de ratones de experimentación. Es necesario un operador entrenado para sacar todo el rendimiento que la técnica ofrece.

#### CONCLUSIÓN

Utilizamos la ecografía de contraste en vez de ecografía sin contraste porque puede mostrar la diferencia entre tejidos sanos y patológicos. En el caso de los tumores, la diferencia se debe principalmente al hecho de que el cáncer, en principio, presenta más flujo sanguíneo, por lo que en una ecografía de contraste puede aparecer más brillante que el tejido normal o desaparecer de la sangre más rápido que la parte normal circundante. Sin embargo, se requiere experiencia para interpretar estas imágenes, ya que otras patologías o estructuras podrían también tener un patrón de contraste similar. Aun así, es una herramienta muy útil para el diagnóstico y seguimiento de los cambios en la microvascularización tumoral, que a pesar de ser técnicamente compleja con un buen entrenamiento se consiguen resultados reproducibles y satisfactorios de manera incruenta.

#### **AGRADECIMIENTOS**

Damos las gracias al grupo de oncología experimental del CNIO por las imágenes de animales con cáncer de páncreas y a la unidad de animalario de CNIO por su apoyo. A Visualsonics por las imágenes del equipo.

#### **BIBLIOGRAFÍA**

- 1. Frinking P., Segers T., Luan Y., et. al. Three Decades of Ultrasound Contrast Agents: A Review of the Past, Present and Future Improvements. Ultrasound Med Biol. 2020;46(4):892-908.
- 2. Ohlerth S. and O'Brien RT. Contrast ultrasound: general principles and veterinary clinical applications. Vet J. 2007;174(3):501-12.
- 3. Hyvelin J.M., Tardy I., Arbogast C., et al. Use of ultrasound contrast agent microbubbles in preclinical research: recommendations for small animal imaging. Invest Radiol. 2013;48(8):570-83.
- Van Rooij T., Daeichin V., Skachkov I., et al. Targeted ultrasound contrast agents for ultrasound molecular imaging and therapy. Int J Hyperthermia. 2015;31(2):90-106.
- Pochon S., Tardy I., Bussat P., et al. BR55: A lipopeptide-based VEGFR2targeted ultrasound contrast agent for molecular imaging of angiogenesis. Invest Radiol. 2010;45:89-95.

## **TÉCNICAS**

- 6. Smeenge M., Tranquart F., Mannaerts C.K., et al. First-in-Human Ultrasound Molecular Imaging with a VEGFR2-Specific Ultrasound Molecular Contrast Agent (BR55) in Prostate Cancer: A Safety and Feasibility Pilot Study. Invest Radiol. 2017;52(7):419-27.
- 7. Willmann J.K., Bonomo L., Testa A.C., et al. Ultrasound Molecular Imaging with BR55 in Patients with Breast and Ovarian Lesions: First-in-Human Results [published correction appears in J Clin Oncol. 2017 Sep 1;35(25):2980]. J Clin Oncol. 2017;35(19):2133-40.
- 8. McCulloch M., Gresser C., Moos S., et al. Ultrasound contrast physics: A series on contrast echocardiography, article 3. J Am Soc Echocardiogr. 2000,13 (10):959-67.
- 9. Lindner J.R. *Microbubbles in medical imaging: current applications and future directions*. Nat Rev Drug Discov. 2004;3(6):527-32.
- 10. Díez Bru N. *Ecografía abdominal en pequeños animales*. Clínica Veterinaria de pequeños animales, 1992, 12(3):163.
- 11. Lamb C.R. Abdominal ultrasonography in small animals: Examination of the liver, spleen and pancreas. J Small Anim. Pract. 1990;31:6-15.
- 12. Annese T., Tamma R., Ruggieri S., et al. Angiogenesis in pancreatic cancer: pre-clinical and clinical studies. Cancers (basel). 2019;11(3):381.



Más de 400 socios relacionados con el sector de los animalarios



publicidad.revista@secal.es



## RED

## WASHERS

¡DESCUBRE TU NUEVA ZONA DE LAVADO!



- MAYOR RENDIMIENTO Y PRODUCTIVIDAD
  - MAYOR FLEXIBILIDAD Y FACILIDAD DE USO
    - MAYOR ADECUACIÓN DEL ESPACIO OPERATIVO
      - MAYOR AHORRO DE CONSUMOS EN SUMINISTROS



representado por

**evenue** matachana | +50 | YEARS

## ÉTICA Y LEGISLACIÓN

### La comisión nacional de Bienestar Animal

#### Xavier Manteca Vilanova

Catedrático del Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos, Facultad de veterinaria, Universitat Autònoma de Barcelona

Palabras clave: comisión, bienestar, veterinaria.

#### Prólogo

En este número incluimos un artículo de nuestro compañero Xavier Manteca Vilanova, aprovechando su participación en la Comisión Nacional de Bienestar Animal organizada por la Organización Veterinaria Colegial (ver noticia).

Xavier Manteca obtuvo su licenciatura y doctorado en veterinaria en la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) y realizó su master de especialización en comportamiento animal aplicado y bienestar animal en la Universidad de Edimburgo (Escocia). Diplomado por el Colegio Europeo de Bienestar Animal y Medicina del Comportamiento (ECAWBM, del inglés European College of Animal Welfare and Behavioural Medicine). Actualmente, es catedrático del Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la facultad de veterinaria de la UAB, donde imparte clases de etología y bienestar animal.

Sus principales líneas de investigación hacen referencia al comportamiento y bienestar de los animales de producción. Ha sido miembro de varios grupos de trabajo del Panel de Salud y Bienestar Animal de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y ha publicado alrededor de 100 artículos en revistas internacionales de prestigio.

Un saludo,

#### Jesús Martínez Palacio

La Comisión Nacional de Bienestar Animal (CNBA) fue creada por el Consejo General de Colegios Veterinarios de España (CGCVE) y celebró su primera reunión el 20 de febrero de 2018. La creación de la CNBA responde al compromiso adquirido por el CGCVE durante la Conferencia Veterinaria y Bienestar Animal que tuvo lugar en Almagro en noviembre de 2017.

La CNBA tiene como objetivos principales convertirse en interlocutora sobre temas de bienestar animal de Colegios y veterinarios, responder a la creciente conciencia ciudadana sobre el

bienestar de los animales, y promover el liderazgo de la profesión veterinaria en este ámbito, impulsando el compromiso ético de los veterinarios en la mejora de las condiciones de vida de los animales.

Como parte de sus actividades, la CNBA elaborará documentos basados en evidencias científicas sobre temas concretos que sean de interés para la profesión veterinaria en el ámbito del bienestar animal, incluyendo (entre otros muchos) un documento sobre el maltrato de animales de compañía. Así mismo, también elaborará documentos de interés general con el objetivo de informar a la opinión pública sobre la importancia del bienestar animal y su relación con la salud de las personas.

La CNBA participó en la organización de la Segunda Conferencia de Bienestar Animal que se celebró en Zaragoza en noviembre de 2018. Cuando la situación sanitaria lo permita, la CNBA tiene como objetivo organizar la tercera conferencia sobre el tema.

La CNBA está integrada por Luis Alberto Calvo Sáez (Presidente del CGCVE y presidente de la CNBA), Rufino Rivero Hernández (Secretario General del CGCVE y secretario de la CNBA), José Ramón Caballero de la Calle (Consejero del CGCVE y vocal de la CNBA), Gonzalo Moreno del Val (Consejero del CGCVE y vocal de la CNBA), Antonio Palomo Yagüe (vocal de la CNBA), Xavier Manteca Vilanova (vocal de la CNBA), Jesús de la Fuente Vázquez (vocal de la CNBA) y Alfredo Fernández Álvarez (vocal de la CNBA).

El bienestar de los animales ha adquirido una importancia creciente en los últimos años, y la profesión veterinaria tiene la oportunidad y la responsabilidad de contribuir de manera decisiva a mejorar el bienestar de los animales en tanto que son seres sintientes. Para ello, la CNBA considera imprescindible impulsar la formación sobre bienestar animal de los veterinarios y espera contribuir a dicha formación, aunando el rigor científico con una visión práctica.

 Saber más: https://www.diarioveterinario.com/t/2093700/definiran -concepto-bienestar-animalfacilitartrabajoveterinario?utm\_source= newsletter&utm\_medium=email&utm\_campaign=Newsletter%20 www.diarioveterinario.com

## **SEGURIDAD EN 5'**

ANIMALES DE LABORATORIO

OTOÑO 2020 / NÚMERO 87

### ¿Cuánto gastan las empresas en prevención?

#### Jesús Martínez Palacio

Técnico Superior en Prevención de Riesgos Laborales

Palabras clave: prevención, gasto, coste.

Los técnicos de Prevención en Riesgos Laborales siempre decimos que en Prevención no se gasta, se invierte. Son muchísimos los estudios del coste de la 'no prevención' (bajas laborales, indemnizaciones, pérdidas de tiempo y materiales...). Pero sin embargo son muy pocos los que han estudiado lo que verdaderamente las empresas gastan en prevención.

Hoy os resumo un artículo reciente<sup>1</sup> en el que han estudiado este tema en Canadá. Lamentablemente, no tenemos datos de España, pero la creciente globalización nos hace pensar en que la situación podría ser muy similar.

- De promedio, las empresas canadienses gastan unos 900€ al año por trabajador en prevención de riesgos laborales (PRL). Si lo analizamos por sectores, en el sector sanitario el gasto baja hasta los 705€; bajaríamos aún más si nos apuntamos a la administración pública (en muchos casos es así), hasta los 687€; y el récord absoluto, lo tenemos si nos apuntamos al sector de investigación con un gasto promedio de 592€ por empleado y año.
- Si calculamos un coste laboral promedio (1.764 horas anuales a 15€/h en España y a 17€/h en la zona Euro y 900€ de gasto promedio en PRL) veremos que el gasto en prevención por trabajador y año va del 3% al 3,4% (zona Euro y España respectivamente) del total, ¿mucho? o ¿poco?

Otra manera de verlo es en qué se gastan esos 900€ de manera intuitiva; ¿cuál pensáis que es el mayor gasto en prevención? pues os lo cuento yo. El principal coste corresponde a la organización, gestión y gastos de personal que se llevan un 58%. Después la formación y entrenamiento de trabajadores, con un 22% del gasto. Los materiales y equipos de protección se llevan un 14% del presupuesto. La inversión en equipos de protección sube hasta el 4%. Finalmente, se gasta un 2% en servicios profesionales externos.

En fin, unos datos, espero que os hayan interesado.

#### **BIBLIOGRAFÍA**

 Mustard C., Tompa E., Landsman V., et al. What do employers spend to protect the health of workers? Scand J Work Environ Health. 2019;45(3):308-11.





### Complete Care Competence

## Asegurando su Investigación



#### Su Colaborador para el Cuidado del Animal de Laboratorio

Experimente la diferencia: soluciones completas para su trabajo de investigación. Benefíciese de la competencia del fabricante en las ciencias del animal de laboratorio.

Quality. Reliability. SAFEty.



Diets Custom Diets Bedding Enrichment Services









DIETS

CUSTOM DIETS

BEDDING

ENRICHMENT



### Como gestionar una colonia de ratones

Mª José Peinado Cahuchola Centro de Biología Molecular Severo Ochoa

Palabras clave: destete, genotipado, colonia.

Mi nombre es Ma José y trabajo como técnico en el animalario del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO). En este artículo os mostraré uno de los trabajos fundamentales en un animalario: la gestión de las colonias de ratones.

En mi centro, la gestión se puede llevar a cabo tanto para el propio animalario manteniendo un pequeño *stock* de animales que utilizamos para renovar cruces, realizar rederivaciones y/o criopreservar embriones; como prestando servicio a grupos/laboratorios de investigación—como, posiblemente, ocurra en la mayor parte de los centros, donde los técnicos nos ocupamos de la gestión y mantenimiento de los animales WTy/o transgénicos—.

Antes de comenzar con el fundamento de la técnica, es importante tener en cuenta la fisiología reproductiva del ratón. La madurez sexual en los machos es de 6-8 semanas y de 4-6 semanas en las hembras. Las hembras pueden tener una vida sexual de hasta 14 semanas, si son demasiado mayores no nos van a servir para tal fin.

También vamos a necesitar material específico como son: marcadores de orejas (ver Figura 1), pinzas, tubos eppendorf, papel de filtro, etanol 70%, cauterizador (ver Figura 2) y enriquecimiento ambiental.



Figura 1.- Dos tipos de marcadores de orejas.



Figura 2.- Cauterizador.

Empezamos cruzando los animales indicados según los genotipos de interés (previamente se ha realizado una PCR en el laboratorio). Para ello, en una cubeta colocamos a los animales correspondientes; lo más común en nuestro centro es que sean parejas (macho x hembra) o tríos (macho x 2 hembras). ¡No debemos olvidar el enriquecimiento ambiental!

La cronología a seguir es la siguiente:

 A los 19-21 días, aproximadamente, después de que se haya producido la fecundación, tenemos la primera camada (ver Figura 3). Podemos ir haciendo un seguimiento visual de la gestación de la hembra o mirar si existe el tapón vaginal mucoso tras la monta.



Figura 3.- Camada de ratones recién nacidos.

## AL CUIDADO

- A los 21 días destetamos la camada (ver Figura 4), sexamos los animales para separar los machos de las hembras y los colocamos en cubetas formando grupos diferenciados. Hay que tener en cuenta la cantidad de animales por cubeta según las dimensiones que vienen reflejadas en el *Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.* 



Figura 4.- Camada de 21 días de edad.

- Preparamos todo el material en un papel de filtro y rotulamos los tubos eppendorf<sup>®</sup> con los datos de nuestros animales (nº animal, línea, sexo).
- Inmovilizamos al animal y con un marcador realizamos las muescas en las orejas correspondientes a la numeración que vayamos a hacer para poder identificarlos (ver Figura 5). En nuestro centro usamos un método que minimiza la cantidad de muescas realizadas con combinaciones de unidades y decenas (p. Ej. 4+1+10=15).

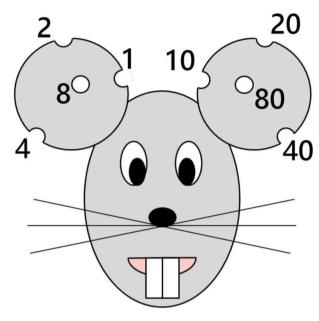


Imagen suministrada por la autoría

Figura 5.- Esquema empleado para el marcaje de las orejas.

- Una vez acabamos de marcar al animal, limpiamos el marcador con un papel con etanol 70% para utilizarlo en el siguiente animal y, así, evitar contaminaciones por el material genético previo.
- Después de haber identificado al animal, necesitamos un poco de tejido para realizar el genotipado y saber qué hemos obtenido tras el cruce. Para ello tenemos dos opciones: aprovechar el tejido de las orejitas al hacer la muesca (recomendado) o hacer una pequeña biopsia de cola con el cauterizador.
- Con la pinza limpia, metemos la biopsia en el tubo rotulado correspondiente y lo guardamos en nevera a 4°C hasta realizar la PCR. Si vamos a tardar un periodo largo de tiempo en procesarla es conveniente quardarla a -20°C.
- Tras conocer los genotipos obtenidos y los animales que queremos obtener, volveremos a realizar el mismo procedimiento.

Esta es una de las tareas básicas que realizo en mi día a día. Espero, a todos los que empezáis en este mundillo, haberos hecho llegar unas nociones básicas sobre un procedimiento fundamental en el trabajo de un técnico de animalario.

En nuestro animalario, primero el bienestar animal.





www.secal.es

## ¿Y TÚ, QUÉ OPINAS?

# Colitis por tóxico en ratón (DSS): Dextrano Sulfato Sódico Colitis por estrés en el Investigador (DSS): Demostrando que las Solución es Simple

Victor A. Almendariz<sup>1,2</sup> y Rafael Alayón<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Universitario de Salud Animal y Seguridad Alimentaria, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria <sup>2</sup>Servicio Experimentación Animal, Unidad de Investigación, Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín

Palabras clave: cáncer colorrectal, Dextrano Sulfato Sódico, dextranasa.

Existen evidencias científicas sobre la relación entre enfermedades inflamatorias crónicas del colón como el síndrome de Crohn o la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD, del inglés *Inflammatory Bowel Disease*), con la incidencia de carcinoma colorrectal.

Con el fin de investigar nuevas terapias preventivas para dicho proceso tumoral, se han testado los potenciales terapéuticos de probióticos de varias cepas de *Saccharomyces boulardii*, en un modelo murino de colitis y carcinoma colorrectal inducido. Para ello, se siguió un protocolo ampliamente usado en la inducción de carcinomas, en el que se inyecta Azoximetano (AOM) –mutágeno usado en oncología experimental para causar tumores de colon en animales de laboratorio—, seguido de la administración de Dextrano Sulfato Sódico (DSS) –agente con efectos tóxicos directos sobre el epitelio del colon— con el fin de provocar colitis a los animales y favorecer la carcinogénesis.

Actualmente, en modelos murinos, existen multitud de ensayos que sitúan al DSS como proinflamatorio idóneo. Dicho compuesto se administra por vía oral, en una solución que puede variar entre el 1% y el 3%, en función de la susceptibilidad de la cepa de ratón empleada y del grado de colitis deseada.

El estudio citado se llevó a cabo testando el probiótico en ratones de estirpe C57BL/6 (cepa probada con éxito con este método para la inducción del carcinoma colorrectal), estableciendo tres grupos con una n=8 en cada grupo: Grupo control (GC) con agua potable *ad libitum*; Grupo con AOM + DSS (GA); y Grupo con *Saccharomyces boulardii* + AOM + DSS (GPA).

Este ensayo duró 12 semanas y se dividió en tres ciclos de administración de DSS, con administración previa del probiótico dos semanas antes del primer ciclo y hasta el final del estudio en el grupo GPA. Además, 2 días antes del primer ciclo de DSS, se inyectó el agente mutágeno AOM en los grupos GA y GPA. Cada ciclo de DSS consta de 1 semana de administración en el agua de bebida *ad libitum*, seguida de dos semanas de "descanso".

Los animales pertenecientes al grupo GPA recibieron el probiótico en forma liofilizada en los pellets de su dieta convencional de mantenimiento, a una concentración de 2,5x10° UFC/g durante 87 días.

Para la administración del AOM se optó por usar una dosis de 10 mg/kg, a una concentración que garantizara dicha dosis en un volumen de inyección intraperitoneal de 0,25 ml/animal. El tóxico se disolvió en solución salina al 0,9% y se administró a los grupos GA y GPA. Respecto al DSS, se optó por un peso molecular de 40 kDa y una concentración de 2,5% en agua destilada estéril.

Teniendo en cuenta que cada ratón bebe en torno a 4 ml/día y que en cada cubeta hay 4 ratones, se les introducían biberones con 150 ml de DSS al 2,5% en el primer día de cada ciclo, y se retiraban en el día 7 cambiándolos por otros con agua potable.

Una vez Ilevado a cabo el diseño experimental, se contrastaron los resultados de los grupos GA con estudios previos de otros grupos de investigación, realizados con probióticos similares empleando el mismo modelo de colitis más carcinoma colorrectal inducido. En éstos, el 100% de los ratones inducidos

#### **ANIMALES DE LABORATORIO**

OTOÑO 2020 / NÚMERO 87

con DSS presentaban heces sanguinolentas y diarrea; sin embargo, en nuestro grupo GA, sólo el 15% de los animales presentaron los mismos signos. Además, en los estudios de otros grupos de investigación el porcentaje de animales con carcinoma colorrectal era del 75%, frente al 0% de los individuos del grupo GA del presente estudio.

A la vista de los resultados tan inesperados, se decidió investigar la causa de este hecho.

#### ¿YTÚ QUÉ OPINAS?

¿Qué ha podido ocurrir?

¿Se han seguido los protocolos de manera rigurosa?

¿El material usado estaba en correcto estado?

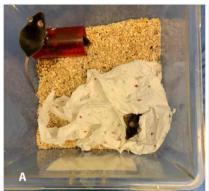
¿Propondrías cambios en el diseño experimental?

#### SOLUCIÓN

Con el fin de entender los resultados obtenidos, se tuvo en cuenta que para este diseño experimental existen algunos pasos que requieren preparación de reactivos; por lo que es de vital importancia examinar dicho proceso y asegurar el riguroso seguimiento de los protocolos de preparación y conservación de los compuestos usados.

Ante la llamativa baja incidencia de colitis del grupo GA respecto a otros estudios, se sospecha de un fallo relacionado con la administración de DSS. Analizando nuevamente el protocolo, se decide ampliar la información y comparar en profundidad las referencias bibliográficas consultadas para estudios similares, observándose que los kDa de la molécula de DSS son de vital importancia respecto a parámetros como: alcance, localización de las lesiones o actividad patógena. Tras la revisión, esta hipótesis quedó descartada debido a que el DSS usado presenta un peso molecular de 40 kDa, estando dentro del rango útil recomendado de esta molécula como inductor de colitis.

Al releer el protocolo descrito por Neufert et al.<sup>1</sup>, nos dimos cuenta que existe un importante detalle que no consideramos; los biberones con DSS se deben cambiar con disolución fresca de DSS cada dos días en cada ciclo, mientras que en nuestro diseño los biberones fueron llenados una única vez por ciclo (ver Figura 1).



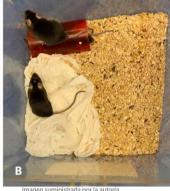


Figura1.- Grupos de ratones macho C57BL/6 con sensibilidad moderada frente a DSS para el desarrollo de colitis (Neufert, C., et al. 2007). A. Con administración de DSS (40 kDa, 2,5% en agua destilada estéril) y renovación de la solución cada 48 h. Obsérvese la presencia de manchas de sangre (típico de la colitis generada con este modelo) en el papel de celulosa empleado como enriquecimiento. B. Con administración de DSS, pero sin renovación a lo largo de una semana. No se observan manchas de sangre.

Lógicamente, se pensó que el tiempo, la temperatura y/o algunos microorganismos jugaban a favor de una posible degradación de la disolución de DSS. Inicialmente, se señaló a la flora intestinal como sospechosa de la alteración de su estructura, pero quedó descartada, ya que diversos estudios demuestran que no afecta a su eficacia.

Tras una intensa búsqueda, se encontró una posible explicación relacionada con la enzima dextranasa. Profundizando en el tema, se comprobó que estas enzimas lisan el dextrano provocando una pérdida de función y disminuyendo los kDa de las moléculas de DSS. Estas enzimas pueden estar producidas por diversos hongos ambientales comunes, como algunas especies de Penicillium spp, Candida spp.2, y algunas bacterias ampliamente extendidas como las del género Lactobacillus spp. o Streptococcus spp.<sup>3,4</sup>. Sabiendo esto, el grupo experimental tomó algunas decisiones para futuros experimentos:

1. Los biberones en los que se administra el DSS deben estar esterilizados para evitar transportar cualquier agente del medio que pueda alterar la estructura del DSS.

## ¿Y TÚ, QUÉ OPINAS?

2. Los biberones esterilizados deben rellenarse con una solución fresca de DSS cada 2 días, con el fin de evitar contaminación por parte de la microbiota oral y del ambiente, interfiriendo con el normal desarrollo del estudio como se indica en los protocolos sobre el modelo murino de inducción de la carcinogénesis de colon¹.

#### **BIBLIOGRAFÍA**

- Neufert C., Becker C., and Neurath M.F. An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammationdriven tumor progression. Nature Protocols. 2007;2(8),1998-2004.
- 2. Huang R., Zhong L., Xie F., et al. Purification, Characterization and Degradation Performance of a Novel Dextranase from Penicillium cyclopium CICC-4022. Int J Mol Sci. 2019;20(6):1360.
- 3. Bailey R.W., Hutson D.H., and Weigel H. *The action of a Lactobacillus bifidus dextranase on a branched dextran*. Biochem J. 1961;80(3),514-9.
- Igarashi T., Morisaki H., and Goto N. Molecular characterization of dextranase from Streptococcus rattus. Microbiol Inmunol. 2004,48(3),155-62.



## Todo lo que **necesitas saber**

Anúnciate en **ANIMALES DE LABORATORIO**, la revista de habla hispana más importante del sector, y posiciona tus productos directamente en manos de los animalarios.



www.secal.es



### Just What You'd Expect from a Solutions Provider.



Allentown is proud to introduce our newest line of Washing & Contamination Control Systems for the Laboratory Animal Science Industry! As an end-to-end Solutions Provider, dedicated to fulfilling the needs of all segments of our industry, these new solutions have been designed and engineered to provide the highest levels of efficiency and flexibility available on the market today. Our current line of Washing & Contamination Control products includes:

Cabinet Washers / Rack Washers / Tunnel Washers / Air Showers / Decontamination Chambers Transfer Stations / Pass-Through Boxes / Bottle Processing Equipment



## REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA

### Transmisión de caracteres genéticos

#### Jordi Pérez Tur<sup>1,2,3</sup>

. Unitat de Genètica Molecular, Institut de Biomedicina deValència-CSIC <sup>2</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED) <sup>3</sup>Unidad Mixta de Neurología y Genética, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe

Palabras clave: distancia genética, mapa genético, recombinación.

#### INTRODUCCIÓN

El 25 de abril de 1953, Francis Crick y James Watson publicaron la estructura tridimensional del ADN en un artículo de poco más de una página en *Nature*<sup>1</sup>. Ese trabajo se gestó en el Laboratorio Cavendish del MRC, en la Universidad de Cambridge (Reino Unido) y supuso el inicio de lo que hoy conocemos como Biología Molecular. Uno de sus principales artífices fue el sudafricano Sydney Brenner quien pudo observar de primera mano la estructura descrita por Watson y Crick en su laboratorio en una experiencia que resultó "iluminadora" según cuenta<sup>2</sup> y que le hizo dedicar su carrera a conocer cómo funciona la maquinaria celular encargada de interpretar las instrucciones de los genes para generar un organismo y, más específicamente, cómo esas instrucciones gobernaban el neurodesarrollo. Fue Crick quien, pocos años después del descubrimiento de la doble hélice enunció el llamado Dogma Central de la Biología en una conferencia publicada después³, publicación en la que participó de manera informal el propio Brenner. En ese trabajo también se propuso la que Crick denominó Hipótesis de la Secuencia según la cual la secuencia de bases del ADN codificaba los aminoácidos que iban a formar parte de las proteínas. Estas dos hipótesis se propusieron sin evidencia científica directa que las apoyara, Crick se basó en resultados previos que apoyaban su formulación si bien sin desarrollar la experimentación necesaria para demostrarlas de manera concluyente. A partir de ese momento, diversos hallazgos fueron sentando las bases para determinar los mecanismos moleculares implicados en la transmisión de la información genética en los organismos incluyendo el descifrado del código genético.

Más tarde, en 1972, los experimentos del equipo de Paul Berg demostraron que era posible combinar ADN de diferentes fuentes<sup>4</sup>, hallazgo que permitió posteriormente a Herbert Boyer y a Stanley Cohen demostrar que esas moléculas de ADN podían introducirse en bacterias y reproducirse en ellas<sup>5</sup>. Con estos experimentos, comenzó la ingeniería genética, la principal herramienta que ha permitido estudiar la función de los genes gracias a la tecnología del ADN recombinante. Una de las herramientas más potentes que se han generado a partir de esta tecnología es la de la generación de modelos transgénicos, organismos animales modificados genéticamente, para facilitar el estudio de la función de un gen de interés.

En este trabajo, repasaré las bases moleculares y teóricas de los mecanismos de herencia que deben tenerse en cuenta a la hora de diseñar e interpretar adecuadamente la experimentación con el uso de estos modelos, así como las fuentes de variabilidad que existen en los modelos.

#### LA HERENCIA DE LOS CARACTERES: DE CONEJOS, GUISANTES Y RATONES

Hacia el final del siglo XIX, Walter Heape demostró que era posible transferir embriones entre dos hembras de conejo de diferentes razas y que esa transferencia producía animales viables<sup>6</sup>. El desarrollo posterior de diferentes técnicas importantes como la capacidad de manipular embriones *in vitro*, de introducir material foráneo en oocitos y el cultivar estos fuera del organismo, permitió que, en 1981, Gordon y Ruddle demostraran que era posible introducir material genético en un mamífero y conseguir que ese material fuera transmitido a su descendencia<sup>7</sup>. Ese hallazgo supuso el pistoletazo de salida para la generalización del uso de la transgénesis como una herramienta fundamental en el estudio de la función de los genes de un organismo.

Durante siglos, el ser humano ha estado aplicando conceptos propios de la herencia genética en su propio beneficio. Hace más de 6.000 años, unas tablas babilonias ya mostraban una estirpe de caballos con características heredables. Igualmente, hay evidencias

## REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA

#### ANIMALES DE LABORATORIO

OTOÑO 2020 / NÚMERO 87

de cómo se cruzaban variedades de plantas para obtener otras nuevas con las características deseadas. Por otro lado, tanto Hipócrates como Aristóteles postularon que los caracteres se pasaban de los progenitores a sus descendientes. Sin embargo, las bases y los mecanismos moleculares que gobernaban estos procesos no fueron conocidos hasta el desarrollo de lo que hoy conocemos como *genética*.

Esta disciplina surge, oficialmente, en 1865 con la publicación de los hallazgos de Mendel<sup>®</sup>. Este monje trabajó con un organismo modelo: guisantes. Mediante un minucioso y paciente trabajo realizando polinizaciones, retropolinizaciones y polinizaciones cruzadas, pudo determinar las que hoy se conocen como leyes de Mendel o de segregación de los caracteres. Lo que Mendel determinó con cierta fortuna (que después despertaría suspicacias sobre su trabajo, llegando a acusársele de ajustar los datos a su teoría) fue que los caracteres se transmitían de progenitores a descendientes siguiendo sus principios: el de uniformidad, el de segregación y el de transmisión independiente. Estudios muy posteriores, revelaron ciertas excepciones a estos principios, así en el caso del primero de ellos, la determinación de que ciertos caracteres se expresaban con mayor o menor intensidad entre progenitores y descendientes o que su expresión no era únicamente dependiente de su presencia, llevó a los conceptos de expresividad y penetrancia de los caracteres. Igualmente, el concepto de alelo es posterior, si bien ya se adivinaba en los trabajos de Mendel.

Los principios de Mendel, además de significar el inicio de la comprensión de la heredabilidad de los caracteres, fueron también relevantes por su precisión y por la meticulosidad de su diseño. Mendel se preocupó de seleccionar bien sus tipos parentales,

asegurándose de que se trataba de líneas puras de manera que una generación tras otra, los siete caracteres que él estudió (altura de la planta, forma de la vaina, color de la vaina, forma del guisante, color del guisante, color de la flor, y posición de la flor) se mantuvieran inalterados. Sin saberlo, aunque posiblemente intuyéndolo, sentó las bases de la necesidad de disponer de modelos de fondos puros, en contraposición a formas híbridas, para el estudio sistemático de los caracteres.

Pero los trabajos de Mendel también sirven de ejemplo por su tenacidad, pasando varios años para permitir la recogida de un volumen suficiente de datos, o por su uso de la estadística, demostrando la necesidad de un número suficiente de observaciones para interpretar de manera precisa los datos recogidos.

Cabe decir también que Mendel fue afortunado, puesto que todos los caracteres que estudió se encontraban codificados, cada uno de ellos, en un único gen, y además, segregaban de manera independiente. ¿Qué hubiera sucedido si se hubiera dedicado a estudiar caracteres gobernados por genes sin un patrón de herencia tan claro o por genes que se encontraran físicamente cercanos? De haber sucedido esto último, hubiera identificado cómo determinadas parejas de caracteres se transmitían de preferencia juntas, reflejando la cercanía física de los genes que las determinan.

Mendel puso en evidencia los principales modos de herencia de caracteres gobernados por un único gen: herencia dominante y herencia recesiva. Estos son claramente los modos de herencia mayoritarios, pero no son los únicos que existen (ver Tabla 1).

Tabla 1.-Tipos de herencia genética de tipo mendeliano.

Tipo de herencia	Definición	Ejemplos (en humanos)
Autosómica dominante	El carácter lo presentan por igual los homocigotos y los heterocigotos.	Enfermedad de Huntington
Autosómica recesiva	El carácter solamente se presenta en homocigosis.	Enfermedad de Parkinson debida a mutaciones en <i>PARK2</i>
Codominante	Ambos alelos se manifiestan en el carácter.	Grupo sanguíneo ABO
Ligada al X, dominante	El gen que determina el carácter es dominante, pero se encuentra en el cromosoma X lo que implica que se manifestará tanto en machos como en hembras. Generalmente, el efecto en machos es más agresivo que en hembras. En este caso, el macho transmite el carácter a las hembras de su descendencia, nunca a los machos.	Síndrome de Rett
Ligada al X, recesiva	El gen que determina el carácter es recesivo y se encuentra en el cromosoma X. Esto hace que los machos se vean siempre afectados mientras que en las hembras el carácter sólo aparece cuando ambos cromosomas X presentan el alelo mutado.	Enfermedad de Menkes

## REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA

Tipo de herencia	Definición	Ejemplos (en humanos)
Ligada al Y	El carácter depende de un gen situado en el cromosoma Y, lo que hace que únicamente se de en machos.	Hipertricosis de la oreja
Mitocondrial	El carácter depende de un gen localizado en el ADN mitocondrial, lo que conlleva que sea heredado, de manera casi exclusiva, por vía materna.	Neuropatía óptica hereditaria de Leber

Existen otros modos de herencia que siguen las leyes de Mendel si bien con ciertas características peculiares. Así, mientras los caracteres mendelianos clásicos presentan dos fenotipos (dominante o recesivo), existen modos de herencia intermedia (codominancia, dominancia incompleta) con tres fenotipos posibles y también caracteres en los que pueden existir múltiples alelos que dan lugar a tres o más fenotipos. Estos alelos se transmiten según las leyes de Mendel si bien el fenotipo resultante dependerá de qué combinación concreta aparece en el individuo.

#### LA HERENCIA DE LOS CARACTERES: ESCALA DE GRISES

Simultáneamente a la publicación por Mendel de sus hallazgos, Francis Galton publicó sus propias observaciones en "Talento y carácter hereditarios" en el que se dedicó a medir, aplicando metodología estadística, diversos caracteres humanos, fundamentalmente de carácter continuo (peso, altura, capacidad pulmonar, agudeza visual y auditiva...) comparando su presentación en padres respecto a la de sus descendientes. El redescubrimiento de los trabajos de Mendel a principios del siglo XX supuso un encontronazo con el trabajo de los biometristas, seguidores de la escuela de Galton, hasta que Fisher demostró, en su trabajo de 1918 "La correlación entre parientes en el supuesto de herencia mendeliana"<sup>10</sup>, que determinados caracteres continuos respondían a la herencia mendeliana no de un único gen, sino de varios de ellos. Cada uno de forma individual seguía las leyes establecidas por Mendel, pero la combinación concreta de sus alelos era la que daría lugar al fenotipo estudiado por Galton.

La herencia no mendeliana puede responder al efecto de dos o unos pocos *loci*, herencia oligogénica, o bien a un número mayor de genes, herencia poligénica, además de responder a contribuciones de mayor o menor efecto del medio ambiente en el que esas variaciones se dan. El término herencia multifactorial o compleja se utiliza para englobar estas diferentes formas de herencia no mendeliana en la que la importancia en el fenotipo final de cada uno de los genes implicados, así como de los efectos del ambiente, es variable, oscilando entre fenotipos debidos a un gen con un efecto más importante respecto al del resto de genes implicados, a fenotipos que son debidos a múltiples genes, cada uno con una contribución a la varianza relativamente pequeña.

Esta herencia multifactorial, o no mendeliana, también sirve para explicar caracteres no continuos sino dicotómicos. En este caso, el efecto poligénico no se observa en el grado de aparición del fenotipo, ya que este se tiene o no se tiene, sino en la susceptibilidad a presentarlo. Este concepto, introducido por Falconer durante los años 70 del pasado siglo, implicaba la existencia de un determinado umbral a partir del cual el fenotipo se manifestaría.

Un caso específico de herencia poligénica es la epistasia, donde la presencia de determinados alelos en un gen influye en la aparición del fenotipo dependiente de otro gen. Cuando el fenotipo resultante refleja la suma del efecto de los alelos presentes en los distintos genes, se habla de herencia poligénica; pero cuando resulta de una interacción de esos alelos distinta a la simple adición de efectos, se habla de interacción epistásica. El caso extremo de interacción epistática se da cuando un alelo en un gen enmascara el efecto de un alelo de otro gen, de manera que el fenotipo relacionado con el segundo gen sólo se manifiesta cuando existe un alelo *permisivo* en el primero.

Existen otras formas de herencia no mendeliana como son la impronta genética, (expresión diferencial de un gen en función del progenitor del que se herede el alelo), la existencia de alelos múltiples en un gen que causan un fenotipo intermedio en función de la dominancia establecida entre ellos, o la existencia de alelos letales. Un caso distinto es el de la disomía uniparental ya que supone una desviación a la primera de las leyes de Mendel dado que el descendiente hereda más de un alelo de uno de sus progenitores. En ocasiones, esta anomalía se refleja en la existencia de un fenotipo determinado como, por ejemplo, la trisomía del cromosoma 21 que origina el síndrome de Down. Sin embargo, es muy frecuente que este tipo de variaciones genéticas no presente alteración del fenotipo. De hecho, existen más de 9.500 regiones en el genoma del ratón en las que puede darse este tipo de variación.

#### APARICIÓN DE MUTACIONES: CUANDO LA ALEATORIEDAD NO RESULTA ALEATORIA

Dos son las principales fuerzas motoras de la existencia de variabilidad genética en las poblaciones: la generación de

### ANIMALES DE LABORATORIO

OTOÑO 2020 / NÚMERO 87

cambios en la secuencia del ADN consecuencia de la tasa de error que acompaña a la maquinaria encargada de copiar el ADN celular y la existencia de procesos de intercambio de material genético entre cromátidas hermanas durante la meiosis.

En cada gameto humano aparecen 38 mutaciones de novo, 3 pequeños indels, 1 mutación que afecta al sitio de procesamiento (splicing) del ARN más algunas mutaciones de elementos transponibles, inestabilidad en microsatélites, duplicaciones o deleciones regionales, por ello se estima que cada individuo es portador de unas 50 mutaciones de novo que aparecen durante la formación de gametos o bien post-cigóticamente<sup>12</sup>. Estas mutaciones son, mayoritariamente, de origen paterno y se ha observado un aumento en el número de ellas con una mayor edad del padre. En el ratón de laboratorio, sin embargo, la tasa de aparición de nuevas mutaciones en el macho se reduce a la mitad<sup>13</sup>. Por otro lado, la tasa de aparición de mutaciones somáticas en el ser humano es de 4 a 25 veces superior a la tasa de aparición de mutaciones en la línea germinal<sup>12</sup>, mientras que es de 2 a 8 veces superior en el macho del ratón de laboratorio 13. Pero incluso en células en las que no se da la replicación del ADN, resulta posible la aparición de alteraciones somáticas en forma de modificaciones epigenéticas que van acumulándose con el paso del tiempo. El efecto de estas mutaciones será tanto mayor cuanto mayor sea la vida media de un organismo debido a la acumulación de variantes potencialmente deletéreas.

Las mutaciones aparecen, en principio, de manera aleatoria. Sin embargo, eso no implica que la probabilidad de aparición de una mutación en el genoma sea uniforme. Existen determinadas zonas del genoma en el que es más probable que éstas aparezcan, los denominados hotspots mutacionales<sup>14</sup>. De igual manera, esta aleatoriedad tampoco es absoluta cuando pensamos en la aparición de mutaciones puntuales, mientras que hay el doble de opciones de que aparezca una transversión (un cambio de una purina por una pirimidina, o viceversa) que una transición (el cambio de una purina por otra o de una pirimidina por otra), la realidad es que en la naturaleza se observa con mayor frecuencia la aparición de este último tipo de modificaciones. Esta separación de una forma completamente aleatorizada de aparición de mutaciones respecto a lo esperado, tanto en posición como en tipo, es debida en gran parte a la propia topología de la molécula de ADN, que deja zonas menos accesibles a ser mutadas, y al mecanismo molecular que da lugar a las mutaciones puntuales, el desplazamiento tautomérico durante la duplicación del ADN que acaba produciendo fundamentalmente transiciones y no transversiones.

Existen dos tipos de hotspots mutacionales. Aquellos que dependen tanto de la secuencia nucleotídica específica como del mecanismo de mutagénesis, hotspots mutacionales intrínsecos, frente a aquellos que son debidos a que la aparición de mutaciones en una región concreta supone un beneficio desde una perspectiva evolutiva. Los mecanismos implicados en los hotspots mutacionales intrínsecos se encuentran tanto en la secuencia de la región implicada como en su efecto en los mecanismos de replicación y/o reparación del ADN. En el caso de pequeñas repeticiones del ADN (homonucleótidos y homopolímeros de unas pocas bases) parece que esta mayor frecuencia mutacional es debida a un problema en el alineamiento del ADN durante el proceso de replicación. Tras este, la maquinaria de reparación actúa añadiendo o eliminando un número concreto de unidades repetidas.

Por otro lado, cuando mutaciones en un punto concreto dan lugar a fenotipos de los que resulta una ventaja competitiva para sus portadores, se fija en la población tanto la mutación concreta como la disponibilidad de ese punto para la generación de nuevos mutantes. Un ejemplo de mutaciones de este tipo son las que aparecen en los genes de las inmunoglobulinas. Su variabilidad genética protege al portador frente a infecciones al permitir una alta tasa mutagénica.

### IDENTIFICACIÓN DE LA VARIACIÓN GENÉTICA: DE EQUILIBRIOS Y DESEQUILIBRIOS (DE LIGAMIENTO)

Una de las aproximaciones metodológicas que ha proporcionado una cantidad importante de información acerca de las causas de múltiples enfermedades humanas es la identificación de genes relacionados con ellas. Tanto formas monogénicas (mendelianas), como multifactoriales (no mendelianas) han sido estudiadas con éxito de manera que, para un número importante de enfermedades, conocemos la base genética implicada.

Históricamente, la búsqueda de la variabilidad genética causante de enfermedades se ha llevado a cabo, cuando no había un conocimiento previo de la misma, mediante la aplicación de la metodología conocida como *análisis de ligamiento (linkage analysis* en inglés). Este método se basa en buscar aquella región del genoma que es común a todos los miembros de la familia, o familias, que presenten la enfermedad en estudio.

Tras ese hallazgo, la segunda parte consistía en diseccionar la región identificada hasta dar con el gen portador de una mutación que explicara la aparición de la enfermedad por alterar la función de la proteína codificada. Con esta técnica, se descubrió, por ejemplo,

el gen causante de la enfermedad de Huntington<sup>15,16</sup>. Este método se basaba en dos características estadísticas aplicadas al estudio del genoma: la existencia del *equilibrio de ligamiento* y la del *desequilibrio de ligamiento*.

El primer concepto es equivalente a la tercera ley de Mendel (la trasmisión independiente de los caracteres genéticos), pero aplicada a un haplotipo, de manera que dos genes están en equilibrio de ligamiento si la frecuencia del haplotipo que forman sus alelos es igual al producto de las frecuencias de cada uno de ellos. Es decir, ambos alelos (ambos genes) se transmiten de manera independiente uno respecto al otro. Por otro lado, el desequilibrio de ligamiento es justamente lo contrario, la asociación no aleatoria de alelos en genes distintos formando un haplotipo concreto. Utilizando una definición muy laxa, podemos definir ambos conceptos como una forma de determinar a qué distancia se encuentran dos genes. Aquellos que segregan de manera aparentemente independiente lo hacen porque se encuentran distantes entre sí, mientras que aquellos que tienen alelos con tendencia a aparecer juntos se encuentran a una pequeña distancia entre ellos. Y cuanto menor sea esa distancia, mayor será el desequilibrio de ligamiento. Consideremos que dos genes, 1 y 2, cada uno con dos alelos (1<sup>A</sup>, 1<sup>B</sup> y 2<sup>B</sup>, 2<sup>D</sup>) se encuentran en desequilibrio de ligamiento. Y que el alelo 2<sup>b</sup> fue una mutación de novo que se dio, un alto número de generaciones anteriores, en un individuo que ya poseía el alelo 1°. Si el desequilibrio de ligamiento fuera completo, el alelo 2º únicamente se observaría en aquellos individuos que también poseyeran el alelo 1ª, pero en la población encontraríamos igualmente individuos con el alelo 1º y el alelo 2º, descendientes de aquellos individuos en los que, en el momento en el que apareció el alelo 2<sup>b</sup>, no se produjo esa mutación de novo (es

decir, el resto de la población). La frecuencia de los haplotipos 1°2° y 1º2º dependerá de que el nuevo alelo (2º) ofrezca una ventaja evolutiva a quienes lo porten o no. En este mismo caso, desequilibrio de ligamiento completo, no observaríamos el haplotipo 1<sup>A</sup>2<sup>b</sup> ya que lo que indica el término "completo", en ocasiones descrito como absoluto, es que siempre que aparece el alelo 2<sup>b</sup> lo hace asociado al 1<sup>a</sup>. Esto refleja que los genes 1 y 2 se encuentran tan cercanos entre ellos que la probabilidad de que ocurra una recombinación que separe el alelo 1ª del alelo 2<sup>b</sup> es prácticamente cero (nunca podrá afirmarse que esta distancia es tal que sea imposible que exista una separación de los alelos, pero en términos de probabilidad podemos decir que esta tiende a cero cuando la distancia tiende, a su vez, a cero). Si, por el contrario, pensamos que los genes 1 y 2 se encuentran en dos cromosomas distintos, o en un mismo cromosoma, pero suficientemente alejados entre sí, entonces los alelos 1<sup>A</sup>, 1<sup>a</sup>, 2<sup>B</sup> y 2<sup>b</sup> segregarán de manera independiente entre ellos y alcanzarán una situación de equilibrio de ligamiento. Cualquier situación intermedia será reflejo de la distancia existente entre los dos genes.

El desequilibrio de ligamiento es una herramienta muy potente para conocer la disposición de los genes en el genoma. Tal y como hizo Mendel en su experimentación, lo que se hace es medir el número de recombinantes que aparecen en un número suficientemente elevado de cruces de ejemplares (sean éstos humanos, ratones o plantas de guisantes). Para ello, se analizan marcadores o fenotipos que nos permiten observar la existencia de segregación conjunta de genes. La Figura 1 nos servirá para ilustrar este hecho (por simplicidad, asumimos que 1A y 2B son dominantes sobre 1a y 2b, respectivamente, de manera que el fenotipo del cruce inicial es AB x ab).

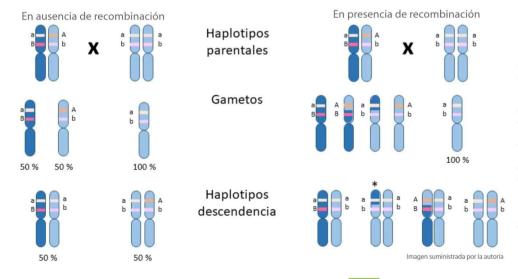


Figura 1.- Determinación de la fracción de recombinación en un cruce. La hipótesis nula es que los genes 1 y 2 están suficientemente cerca como para que no se produzca la recombinación. En ese caso, los haplotipos aB, Ab y ab siempre se mantendrán inalterados de manera que la distribución genotípica de la descendencia será la indicada: el 50% será 1<sup>^</sup>1<sup>^</sup>2<sup>^</sup>2<sup>^</sup>b y el resto será 1<sup>^</sup>1<sup>^</sup>2<sup>^</sup>b2<sup>^</sup>b. Sin embargo, si se da el entrecruzamiento la proporción de cada haplotipo en la descendencia dependerá de la distancia entre los genes, a mayor distancia, mayor probabilidad de entrecruzamiento y mayor frecuencia de haplotipos recombinantes. \* Indica un haplotipo que, aun siendo consecuencia de la recombinación, resulta analíticamente indistinguible, si se analizan sólo los genes 1 y 2, del haplotipo complementario.

### ANIMALES DE LABORATORIO

OTOÑO 2020 / NÚMERO 87

En el supuesto de que no exista recombinación entre los genes 1 y 2 (parte izquierda de la Figura 1), la frecuencia de los haplotipos en la descendencia será de un 50% de un tipo (fenotipo AB) y un 50% del otro (fenotipo ab). Pero si pudiera darse un entrecruzamiento entre ambos genes, la situación sería diferente. La frecuencia de cada haplotipo en los gametos del cruce dependerá de la distancia entre los genes 1 y 2 que será la que determine la probabilidad de que se produzca un entrecruzamiento entre cromátidas homólogas y un determinado número de gametos recombinantes. Esta distancia la podemos determinar estudiando estos genes en la descendencia y observando el número de veces que aparece cada uno de los haplotipos posibles en ella (verTabla 2).

**Tabla 2.-** Ejemplo de distribución de haplotipos/fenotipos a consecuencia de un cruce determinado de gametos.

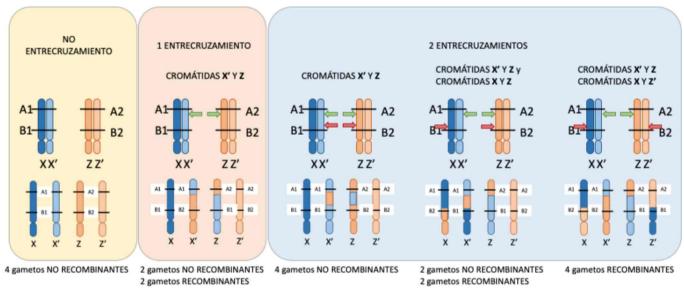
Fenotipo	N⁰ de individuos
AB	718
ab	693
Ab	283
аВ	306
	AB ab Ab

De esta distribución podemos calcular la distancia **genética** que existe entre los genes 1 y 2 mediante el cálculo de la **fracción de recombinación**, la relación existente entre el número de recombinantes (589, en nuestro ejemplo) y el número total de individuos analizados (2.000). En este ejemplo, la fracción de recombinación entre los genes 1 y 2 es de 0,2945 o 29,45%. Cuando la distancia entre los genes es relativamente grande, esta medida es una subestimación de la distancia real ya que puede suceder que se dé una recombinación doble que mantenga el genotipo del descendiente idéntico al del progenitor, aunque sí exista un cromosoma recombinante en el descendiente. En términos generales, la fracción de recombinación solamente

puede estimarse con cierta precisión cuando existe un número impar de recombinaciones entre dos genes.

Como se ha apreciado, antes he hablado de distancia genética, ésta se determina en función de la fracción de recombinación y tiene como unidad al centiMorgan (cM), mientras que la distancia física se determina en función del número de bases nitrogenadas que separan los dos genes y adoptan esa unidad de medida (pb) y sus múltiplos. El cM se define como la distancia entre dos puntos de un cromosoma que tienen una fracción de recombinación de 0,01 (o del 1%). En términos generales, o en promedio, en el ser humano 1 cM equivale a 1 Mpb. Sin embargo, no resulta recomendable utilizar esa aproximación (grosera) entre distancia genética y distancia física ni siguiera en genética humana porque, en realidad, la probabilidad de que se dé un entrecruzamiento entre cromátidas siendo aleatoria, no es uniforme a lo largo del genoma ni es la misma en función del sexo del individuo como veremos más adelante. Con las frecuencias de recombinación se puede construir un mapa ordenado en el que se defina la posición de cada gen respecto a aquellos otros cercanos, pero dado que se trata de un mapa probabilístico, la posición de un gen en él es relativa a la de los genes cercanos. Algo contrario sucede en un mapa físico, en el que la posición de un gen se da en valores absolutos.

Conviene indicar que la fracción de recombinación nunca es superior al 50% ya que cuando se produce el entrecruzamiento, este afecta a dos cromátidas que acaban siendo recombinantes, mientras que las otras dos cromátidas no se ven afectadas en el proceso. Es decir, un entrecruzamiento produce dos cromátidas recombinantes y dos cromátidas inalteradas. Si, por el contrario, la distancia entre los genes en estudio es grande, podría darse más de un entrecruzamiento. En la Figura 2 se representa el resultado de un doble entrecruzamiento. En este caso, hay que considerar que éste puede afectar a 2, 3 o a las 4 cromátidas resultando en un número variable de gametos recombinantes.



EN PROMEDIO: 2 GAMETOS RECOMBINANTES EN UNA MEIOSIS DOBLE

magen suministrada por la autoría

Figura 2.- Representación esquemática del producto de 0, 1 o 2 entrecruzamientos. A la izquierda, se observa la formación de 4 gametos no recombinantes por no producirse ningún entrecruzamiento. En el panel del centro, se representa un único entrecruzamiento, resultando en 2 gametos recombinantes y 2 no recombinantes (se entiende por recombinante aquel en el que no aparecen los alelos A1/B1 o A2/B2). En el panel de la derecha se observa el resultado de un entrecruzamiento doble cuando ambos entrecruzamientos no se dan entre las mismas cromátidas homólogas. Las flechas indican los puntos de entrecruzamiento, el color de las flechas indica el punto en que dos cromátidas homólogas se entrecruzan entre ellas.

La estimación de la distancia genética no siempre puede hacerse mediante la mera observación de la aparición de recombinantes en sucesivas generaciones, para ello se han desarrollado funciones de mapeo como las de Haldane, en 1919, y Kosambi, en 1944. La segunda incorpora la existencia de interferencia, un mecanismo que evita la formación de nuevos entrecruzamientos en regiones adyacentes a aquellas en las que aparece un primer evento de este tipo. Sin embargo, ambas adolecen de obviar la existencia de diferencias concretas en localizaciones específicas del genoma y, aunque han sido extremadamente útiles en la generación de los mapas genéticos, introducen algunos sesgos a la hora de descender a situaciones precisas. Además, dado que la frecuencia de recombinación conocida para genes muy cercanos es pequeña, pocos puntos porcentuales, la interferencia suele ser completa y las frecuencias de recombinación pueden ajustarse a una función aditiva con lo que no resulta necesario aplicar estas transformaciones para la correcta localización de los genes en un mapa.

Si el objetivo general de la investigación biomédica, especialmente la que se basa en las herramientas de la genética, es la identificación de genes o *locus* implicados en la aparición de enfermedades, resulta obvio pensar que es necesario disponer del

conocimiento suficiente como para que los resultados de los estudios de ligamiento (que identifican regiones del genoma comunes a los portadores de una enfermedad en el seno de una, o unas pocas familias) sean tales que nos conduzcan a esa identificación. Para eso, ha resultado crucial el desarrollo de los mapas genéticos del genoma, que permiten localizar con precisión (creciente con el paso del tiempo) los diferentes genes y elementos genéticos en el genoma de un individuo.

### MAPAS GENÉTICOS: UN GOOGLE MAPS DETERMINANTE

Antes de hablar de mapas genéticos, hay que valorar otros puntos. En principio, podría pensarse que la probabilidad de que se produzca un entrecruzamiento en la meiosis es independiente de la región en la que ésta se dé y eso supondría que debería existir una relación lineal entre distancia genética y distancia física. Sin embargo, en realidad, esto no es así. El número y la distribución de los eventos de recombinación en el genoma es diferente entre especies e, incluso, dentro de una especie en función del sexo de un individuo o del genotipo en determinados genes<sup>17</sup>. La recombinación se inicia con la ruptura de una de las cromátidas homólogas, si bien la mayor parte de estos cortes en el ADN se reparan<sup>18</sup>. Cuando no son reparados, estos cortes generan

### ANIMALES DE LABORATORIO

OTOÑO 2020 / NÚMERO 87

un entrecruzamiento que puede dar lugar a dos tipos distintos de estructuras (clases I y II) en función del complejo proteico que los forma. Por otro lado, los entrecruzamientos de clase I están sujetos a interferencia, un mecanismo que evita la formación de nuevos entrecruzamientos en regiones adyacentes a aquellas en las que aparece un primer evento de este tipo<sup>19</sup>. En la mayor parte de las especies, solamente se producen 1 o 2 entrecruzamientos por cromosoma en cada meiosis. En Zelkowsky y colaboradores<sup>17</sup> se revisa la formación de entrecruzamientos en diversas especies.

Como se ha mencionado antes, la frecuencia con la que aparecen entrecruzamientos, dentro de una especie, varía en función del sexo dándose la circunstancia de que en una misma especie no siempre es el mismo sexo el que incorpora más entrecruzamientos. Por ejemplo, en *Mus musculus* se observa una mayor frecuencia de aparición de entrecruzamientos en hembras de la subespecie *M. musculus castaneus* mientras que en la subespecie *M. musculus musculus* eso sucede en los machos<sup>20</sup>. Como regla general, la existencia de un mayor número de entrecruzamientos favorece que un número importante de éstos aparezca en zonas distales de los cromosomas.

Además de las diferencias relacionadas con el sexo, existen diferencias en la probabilidad de que se dé un entrecruzamiento entre unas regiones y otras del genoma. Al igual que sucede con la aparición de mutaciones, existen hotspots recombinatorios, regiones en las que resulta más probable que se produzca un entrecruzamiento frente a desiertos recombinatorios (algunos autores los denominan también regiones recombinatorias frías), regiones donde es raro que se den estos eventos. En ratón, como en humanos, la mayor parte de los hotspots recombinatorios son compartidos entre ambos sexos, si bien una fracción muestra un comportamiento que podría denominarse como "específico de sexo" entendiendo por tal que en un sexo existe una mayor probabilidad de presentar un entrecruzamiento en una región concreta que en el otro sexo. Parece que esta diferencia puede tener que ver, entre otras cosas, con el hecho de que el entrecruzamiento se da en un genoma desmetilado en la hembra mientras en el macho sucede en un genoma metilado<sup>21</sup>. Resulta interesante señalar que, en ratón macho, los desiertos recombinatorios suponen, aproximadamente, el 5% del genoma y coinciden con regiones en las que son frecuentes la aparición de duplicaciones, lo que relaciona la ausencia de recombinación con la presencia de *hotspots* mutacionales para variaciones de tamaño elevado en el número de copias. Igualmente, Liu y colaboradores<sup>22</sup> observan que, en ratón macho, se da un elevado número de entrecruzamientos en las partes distales de los cromosomas que no se observa en igual frecuencia en las hembras.

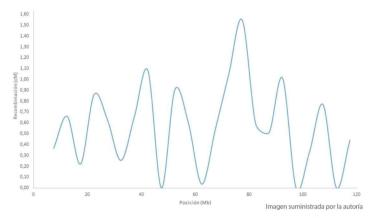
Por todo lo anterior, queda claro que el mapa genético de una especie no puede ser único, sino que han de haber tantos mapas como condicionantes existan que diferencien los individuos: sexo, genotipo... Sin embargo, en realidad, para una especie se suelen definir tres mapas genéticos, uno para cada sexo y un tercero promedio entre los dos.

El uso de mapas genéticos fue fundamental en el estudio de los caracteres cuando la tecnología no había aún permitido disponer de la secuencia (relativamente) completa de los genomas de los organismos de interés. Pero hoy en día somos capaces de disponer de mapas físicos muy precisos de la mayor parte de los organismos, mapas en los que la distancia entre elementos del genoma se señala en pares de bases. ¿Tiene aún sentido hablar, y usar, mapas con distancias genéticas que no siguen una escala lineal, más intuitiva? Pues sí, al menos en el ámbito del estudio de modelos animales de enfermedades humanas ya que en estos, sobre todo en aquellos en los que se introducen genes exógenos, es importante conocer el entorno genético en el que se produce la inserción del gen foráneo, para poder determinar la probabilidad de que se produzcan entrecruzamientos en la descendencia que puedan afectar la función del transgén. Conociendo el punto de inserción de un transgén, y dado que existen mapas genéticos detallados del ratón, y otros organismos modelo, sería posible diseñar experimentos tomando en consideración, por ejemplo, el sexo del animal que porta el transgén.

Como se ha mencionado, el mapa genético de hembras y machos es distinto, así como lo es entre especies. En un completo estudio, Jensen-Seaman y colaboradores<sup>23</sup> muestran cómo la frecuencia de recombinación por megabase es diferente entre cromosomas y cómo no es lineal con la distancia física entre puntos del genoma. De hecho, observan que mientras en rata el cromosoma que muestra un mayor número de entrecruzamientos por meiosis es el 12, en el ratón es el 20 y en humano el 21. Además, encuentran que tanto rata como ratón tienen una menor tasa de recombinación que el humano: 0,62 cM/Mb en rata, 0,57 en ratón y 1,26 en humano (autosomas)<sup>23</sup>. De su trabajo, se observa que, en ratón, no se dan grandes diferencias, en promedio, en la frecuencia de recombinación entre cromosomas con la única excepción del cromosoma 19 que presenta una mayor tasa de recombinación que el resto de cromosomas (cromosoma 19: 1,04 cM/Mb; resto de autosomas: 0,44-0,68 cM/Mb), algo similar sucede en rata con el cromosoma 12.

### CONCLUYENDO: ASPECTOS PRÁCTICOS

La trasmisión de los caracteres genéticos se da mediante un mecanismo de cierta complejidad y, podríamos decir, poca uniformidad. Tanto la aparición de mutaciones como los procesos de recombinación meiótica son, dentro de su aleatoriedad, poco uniformes. Existe todo un conjunto de condicionantes que hace que, al descender a casos concretos, no exista una regla que permita predecir qué tipo de mutación aparecerá, dónde o con qué probabilidad dos genes cualesquiera se puedan trasmitir a la descendencia. En el sector inmobiliario, suelen decir que los tres factores más importantes para tener en cuenta a la hora de lanzar un proyecto, o adquirir una casa, son "localización, localización y localización". En el mundo de la experimentación con modelos animales, a la hora de diseñar y desarrollar cualquier proyecto, es también importante tener en consideración la localización de aquello que queremos analizar. No resulta igual de sencillo, por ejemplo, separar dos genes situados en proximidad en una zona que sea una región recombinatoria fría frente a aquellos situados en un hotspot de recombinación. Además, hemos visto que la frecuencia de recombinación es especie (je, incluso, subespecie!) dependiente, por lo que resulta crucial, antes de empezar a trabajar con los animales, recoger toda la información posible sobre la situación en la que se encuentra nuestro gen, o genes, de interés, en especial, los mapas genéticos de la cepa concreta sobre la que planeamos trabajar (de preferencia, antes de llevar a cabo ninguna experimentación con ella). Una herramienta útil son los mapas de recombinación<sup>24</sup> o, desde un punto de vista práctico, la herramienta Mouse Map Converter (http://cgd.jax.org/mousemapconverter/). En ellos se muestra la posición (generalmente en el eje de las abcisas, en Mb) frente a la relación entre fracción de recombinación por Mb en el eje de ordenadas. De esta manera, podemos definir qué especies resultan de mayor ayuda para conseguir esa separación.



**Figura 3.-** Mapa genético promedio de parte del cromosoma 1<sup>23</sup> . Imagen obtenida del artículo en *open access*.

A modo de ejemplo, tomemos el mapa genético de la Figura 3 (creado con parte de los datos del cromosoma 1 del ratón de laboratorio<sup>23</sup>).

Esa figura se obtiene de los siguientes datos (ver Tabla 3).

**Tabla 3.-** Datos de posición física y recombinación genética en una región del cromosoma 1<sup>23</sup>

Posición	Recombinación	Posición	Recombinación
(Mb)	(cM)	(Mb)	(cM)
7,5	0,36	67,5	0,54
12,5	0,66	72,5	1,05
17,5	0,22	77,5	1,55
22,5	0,86	82,5	0,59
27,5	0,63	87,5	0,51
32,5	0,25	92,5	1,01
37,5	0,66	97,5	0,00
42,5	1,08	102,5	0,33
47,5	0,00	107,5	0,77
52,5	0,90	112,5	0,00
57,5	0,60	117,5	0,44
62,5	0,03		

Podemos ver de esta información que un gen situado en la posición (física) 47,5 Mb tiene muy pocas posibilidades de separarse de un gen cercano por recombinación ya que la frecuencia de recombinación en esa región es nula. Si el gen del que pretendemos separarlo se encuentra en, por ejemplo, la posición 45,0 habrá que tener en cuenta, primero, el mapa específico del sexo y, después, la fracción de recombinación entre ellos. Supongamos que la fracción de recombinación es conocida y se corresponde con un valor de 0,87 cM. Si recordamos que 1 cM implica que la recombinación sucede en un 1% de los descendientes, podemos inferir que para poder determinar que, al menos en una ocasión, los genes que queremos segregar se separen, necesitaremos analizar 100 animales para poder encontrar 1,15 recombinaciones (1/0,87) por lo que, en ese caso, para asegurar que aparece al menos un recombinante será necesario un importante número de individuos. Por otro lado, si queremos segregar un gen localizado en la posición 22,5 Mb de otro localizado en la posición 57,5 Mb podemos inferir, de los datos anteriores, que se encuentran a una distancia genética de, al menos, 4,25 cM (valor obtenido al sumar las fracciones de recombinación de los espacios intermedios y la mitad de las

### **ANIMALES DE LABORATORIO**

OTOÑO 2020 / NÚMERO 87

fracciones correspondientes al punto inicial y final del intervalo) por lo que necesitaremos, aproximadamente, una cuarta parte del número de animales que en el caso anterior.

### **BIBLIOGRAFÍA**

- Watson J.D. and Crick F.H. A structure of deoxyribose nucleic acid. Nature. 1953;171:737-8.
- Sejnowski T. and Brenner S. In the spirit of science: lectures by Sydney Brenner on DNA, worms and brains. World Scientific Publishing (ISBN: 9789813271739). 2018.
- Crick F.H. On Protein Synthesis. Symp Soc Exper Biol. 1958;XII:138-63 (accesible en https://profiles.nlm.nih.gov/spotlight/sc/catalog/nlm:nlmuid-101584582X404-doc).
- Jackson D.A., Symons R.H., and Berg P. Biochemical Method for Inserting New Genetic Information Into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of Escherichia Coli. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1972;69:2904-9.
- Cohen S.N., Chang A.C., Boyer H.W., et al. Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids in Vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1973;70:3240-4.
- 6. Heape W. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster mother. Proc. R. Soc. Lond. 1891;48:457-9.
- Gordon J.W. and Ruddle F.H. Integration and Stable Germ Line Transmission of Genes Injected Into Mouse Pronuclei. Science. 1981,214:1244-6.
- 8. Mendel J.G. "Versuche über Pflanzenhybriden", Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brünn, Bd. IV für das Jahr, 1865, Abhandlungen: 3–47. Imagen de la primera página manuscrita en: https://dnalc.cshl.edu/view/16172-Gallery-3-Gregor-Mendel-Manuscript-1865.html. Traducción al inglés, por Bateson, del trabajo en http://mendelweb.org/Mendel.plain.html
- 9. Galton F. Hereditary talent and character. Macmillan's Magazine. 1865;12:157-66.
- Fisher R.A. The Correlation between Relatives on the Supposition of Mendelian Inheritance. Transactions of the Royal Society of Edinburgh. 1918;52:399-433.
- 11. Locke M.E.O., Milojevic M., Eitutis S.T., et al. Genomic copy number variation in Mus musculus. BMC Genomics. 2015;16:497.
- 12. Lynch M. Rate, molecular spectrum, and consequences of human mutation. Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 2010;107:961-8.

- 13. Uchimura A., Higuchi M., Minakuchi Y., et al. Germline mutation rates and the long-term phenotypic effects of mutation accumulation in wild-type laboratory mice and mutator mice. Genome Res. 2015;25:1125-34.
- 14. Rogozin I.B. and Pavlov Y.I. *Theoretical analysis of mutation hotspots and their DNA sequence context specificity.* Mutation Res. 2003;544:65-85.
- 15. Gusella J.F., Wexler N.S., Conneally P.M., et al. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. Nature. 1983;306:234-8.
- 16. Gilliam T.C., Tanzi R.E., Haines J.L., et al. Localization of the huntington's disease gene to a small segment of chromosome 4 flanked by D4S10 and the telomere. Cell. 1993;50:565-71.
- 17. elkowski M., Olson M.A., Wang M., et al. Diversity and Determinants of Meiotic Recombination Landscapes. Trends Genet. 2019;35:359-70.
- 18. Lake C.M. and Hawley R.S. *The Molecular Control of Meiotic Chromosomal Behavior: Events in Early Meiotic Prophase in Drosophila Oocytes* Ann. Rev. Physiol. 2012;74:425-51.
- 19. Jones G.H. *The control of chiasma distribution*. Symp Soc Exp Biol. 1984;38:293-320.
- 20. Dumont B.L. and Payseur B.A. *Genetic analysis of genome-scale recombination rate evolution in house mice.* PLoS Genet. 2011;7:e1002116.
- 21. Brick K., Thibault-Sennett S., Smagulova F., et al. Extensive sex differences at the initiation of genetic recombination. Nature. 2018;561:338-42.
- 22. Liu E.Y., Morgan A.P., Chesler E.J., et al. High-Resolution Sex-Specific Linkage Maps of the Mouse Reveal Polarized Distribution of Crossovers in Male Germline. Genetics. 2014;197:91-106.
- 23. Jensen-Seaman M.I., Furey T.S., Payseur B.A., et al. Comparative Recombination Rates in the Rat, Mouse, and Human Genomes. Genome Res. 2004;14:528-38.
- 24. Brunschwig H., Levi L., Ben-David E.R., et al. Fine-Scale Maps of Recombination Rates and Hotspots in the Mouse Genome. Genetics. 2012;191:757-64.
- 25. Cox A., Ackert-Bicknell C.L., Dumont B.L., et al. A New Standard Genetic Map for the Laboratory Mouse. Genetics. 2009;182:1335-44.

# Comparación de los efectos de dos protocolos de sedación en cerdos: tiletamina-zolacepam-xilacina versus ketamina-midazolam-xilacina

**Alba Boldó Dolz, Sara Puy López y Dolores C. García Olmo** Centre de Recerca Experimental Biomèdica Aplicada (CREBA), IRBLleida

Palabras clave: sedación, monitorización, cerdo.

### INTRODUCCIÓN

El cerdo es un animal actualmente muy utilizado en investigación biomédica por las similitudes que presenta con el ser humano. Ha quedado demostrado que la extrapolación al hombre de los resultados obtenidos a partir de estos animales es más precisa que con otras especies; tanto, que la investigación con cerdos ya se considera investigación traslacional¹. Se utilizan tanto para investigación como para docencia, y pueden ser útiles para procedimientos quirúrgicos, endoscopia, para llevar a cabo implantación de catéteres o realización de trasplantes, entre muchas posibilidades²⁴.

Dado su tamaño y su carácter estresable, es muy importante tener herramientas y habilidades que nos permitan realizar pequeñas manipulaciones sin sufrimiento para los animales, ni para los experimentadores. Una gran parte de estas herramientas son farmacológicas: protocolos de tranquilización o sedación adecuados al tipo de manipulación que vayamos a realizar. Actualmente, el abanico de principios activos que podemos emplear es muy amplio, y esto nos permite hacer protocolos específicos según el tipo de procedimiento, las características del animal, y las posibilidades logísticas.

Los estudios centrados sólo sobre anestesia y analgesia porcina, con poblaciones e intervenciones homogéneas, son muy escasos. Para suplir esta carencia, se han intentado hacer revisiones sistemáticas, como la de Mikkelsen<sup>5</sup>, en la que después de un exhaustivo esfuerzo, se concluye que se han de diseñar estudios específicos para poder esclarecer los efectos beneficiosos o limitantes de cada protocolo, ya que la información publicada hasta ahora es insuficiente para llegar a conclusiones generales.

El objetivo del presente trabajo fue comparar dos protocolos de sedación en la misma población animal, con el fin de escoger el más válido para algunas de las manipulaciones de nuestra actividad habitual.

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

Se utilizaron 10 cerdos hembra (híbridos comerciales) de un peso entre 35-45 kg, estabulados en el Centre de Recerca Experimental Biomèdica Aplicada (CREBA, Lleida), en las condiciones ambientales recomendadas para la especie. Todo el procedimiento se realizó de acuerdo con la normativa europea, española y autonómica (Directiva 2010/63/UE, Real Decreto 53/2013 y Decret 214/97), y estaba incluido en un proyecto autorizado por el Comité de Ética del Centro, y la Generalitat de Catalunya (nº expediente: 10695).

Las pruebas se realizaron siempre por la mañana, entra las 10 y las 12 horas, con un ayuno de 8 horas de sólidos y sin restricción de agua.

Se probaron dos combinaciones de anestésicos, inyectados por vía intramuscular (IM):

- Grupo TZX (n=5): tiletamina (4 mg/kg) + zolacepam (4 mg/kg;
   Zoletil®100, Virbac, Carros, Francia) + xilacina (2,2 mg/kg).
- Grupo MKX (n=5): midazolam (0,6 mg/kg; Midazolam Normon 50 mg/10 ml, Laboratorios Normon, Madrid) + ketamina (8 mg/kg; Anesketin® 100 mg/ml, Dechra, Bladel, Países Bajos) + xilacina (2,2 mg/kg; Xilagesic® 200 mg/ml, Laboratorios Calier, Les Franqueses del Valles).

Las mezclas siempre fueron preparadas por el mismo operador (técnico), y el ensayo fue ciego para el experimentador (veterinario), que recibía las jeringas envueltas en papel de aluminio.

### ANIMALES DE LABORATORIO

OTOÑO 2020 / NÚMERO 87

Las inyecciones IM se realizaron con agujas de 20G con prolongador para evitar un acercamiento excesivo al animal, y de esta forma evitar que aumentara su estrés (ver Figura 1).



Figura 1.- Inyección intramuscular en cerdos empleando un prolongador.

Desde el momento de la inyección se valoraron los siguientes parámetros:

- <u>Parámetros subjetivos (valorados por el experimentador)</u>: tiempo hasta la pérdida del reflejo, duración de la ausencia de los reflejos de estación y palpebral, y dificultad en el despertar.
- Parámetros objetivos (registrados por monitores electrónicos):
   cada 5 minutos y hasta el minuto 50 tras la inyección,
   se monitorizó la saturación de oxigeno, la frecuencia cardiaca
   (FC), la frecuencia respiratoria (FR) y la temperatura

corporal (TC). Para ello se empleó un monitor modelo iPM 8, marca Mindray, (Shenzhen, China). Los valores de FC se extraían de la pulsioximetría. En validaciones previas se comprobó su plena coincidencia con los valores obtenidos por electrocardiografía con 3 derivaciones.

El veterinario observó a los animales durante todo el procedimiento, y registró movimientos y cualquier incidencia hasta el despertar. Una vez los animales perdían el reflejo de estación, se les puso un lubricante en los ojos, Lubrithal™ (Dechra, Bladel, Países Bajos), para evitar el secado de la córnea.

Durante la sedación, no se realizó ningún otro procedimiento, con el fin de evitar interferencias en los resultados.

Una vez recogidos los datos, las variables cuantitativas se valoraron como media  $\pm$  d.e. (desviación estándar), y se compararon mediante el test de la T de Student. Las variables cualitativas se compararon con el test de Fisher de dos colas. La significación estadística se estableció en p<0,05.

### RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestran los resultados más relevantes tanto de las valoraciones subjetivas, como de la monitorización cardiorrespiratoria.

							ESTU	DIOS	DE CO	MBIN	ACION	ES SEI	DANTES E	N CERDO	os					
Autores, año			Boldó	et al., :	2020				Lu et a	al., 2010	)		Lehmann	et al. 2017		De	Monte	et al., 2	2015	
Fármacos		TZX			MKX			TZX			TZXTr		MDB	MDMo	KDMe		1	TZMe		
										PÉRDI	DA DE I	REFLEJO	OS							
Perdida reflejo estación (min)		1,02			1,32 2,33					2,26		3,81	3,84	2,2			4,15			
Duración perdida reflejo (min)		73			82			62,64			87,57		84	84		45		57		
Perdida reflejo palpebral (min)		13			18				=											
										MOI	NITORIZ	ZACIÓN								
TIEMPOS (min)	5	20	50	5	20	50	5	30	60	5	30	60	_		0	20	30	0	20	30
FC (lpm)	137	122	102	151	138	141	134	107	93	129	110	98	71	76	101	86	81	117	85	78
FR (rpm)	58	56	61	47	50	57	69	48	60	74	44	62	33	36	41	43	49	28	33	34
SpO <sub>2</sub> (%)	92	94	93	94	91	95	91	93	94	93	92	94	92	94	92	94	95	89	90	90
Temperatura corporal (°C)	38,5	38,1	37,6	38,8	38,8	38,0	38,5	37,8	37,3	38,7	38,0	37,5	37,9	37,8	38,2	37,7	37,7	37,0	36,3	36,1

TZX: Tiletamina + Zolazepam+ Xilacina MKX: Midazolam + Ketamina + Xilacina TZXTr: Tiletamina + Zolazepam + Xilacina + Tramadol MDB: Midazolam + Dexmetomidina + Butorfanol MDMo: Midazolam + Dexmetomidina + Morfina KDMe: Ketamina + Dexmetomidina + Metadona TZMe: Tiletamina + Zolazepam + Metadona

**Tabla 1.-** Comparación de los resultados más relevantes obtenidos en el presente estudio con otros previos de distintos autores, en los que se analizó el efecto de combinaciones sedantes que incluían el uso de benzodiacepinas, ketamina y alfa-2-adrenérgicos.

El tiempo medio hasta la pérdida del reflejo de estación fue de 1,02  $\pm$  0,41 minutos, en el grupo TZX y de 1,32  $\pm$  0,47 minutos en el grupo MKX. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre ambos.

La duración de la pérdida del reflejo de estación fue de 73  $\pm$  24 minutos, en el grupo TZX y de 82  $\pm$  37 minutos en el MKX. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre ambos.

En cuanto al reflejo palpebral, lo perdieron 3 animales del grupo TZX, y 4 del grupo MKX. La duración de esta ausencia fue de  $13 \pm 15$ 

minutos en el primer grupo, y de 18 ± 12 minutos en el segundo.

Respecto a los parámetros cardiorrespiratorios monitorizados, en la Tabla 1 se dan los valores medios, y en la Figura 2 se muestra su evolución. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos, en ningún momento de la monitorización entre el minuto 5 y el 50.

En general, con ambas combinaciones de fármacos, se observó una disminución de la TC y la FC, un ligero aumento de la FR, y la saturación de O<sub>2</sub> fue ligeramente oscilante (ver Figura 2).

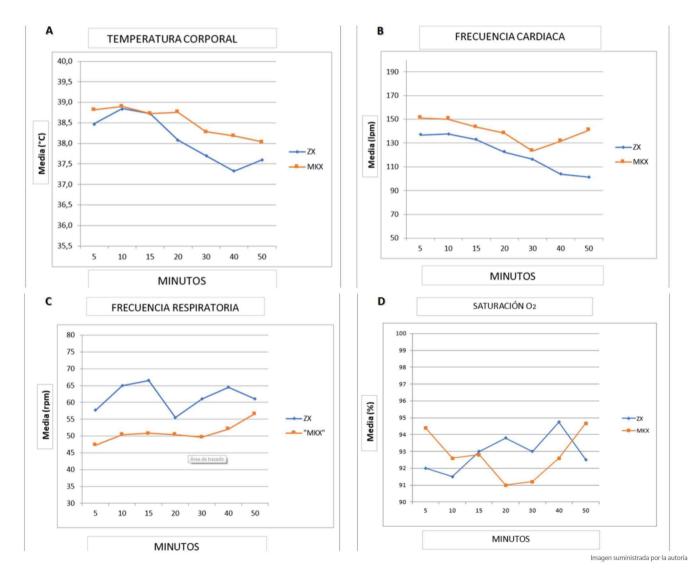


Figura 2.- Representación gráfica de la evolución de los cuatro parámetros cardiorrespiratorios registrados durante la sedación inducida por las dos combinaciones testadas. A. Temperatura corporal; B. Frecuencia cardiaca; C. Frecuencia respiratoria; y D. Saturación de oxígeno.

### ANIMALES DE LABORATORIO

OTOÑO 2020 / NÚMERO 87

En el 70% de los animales hubo presencia de nistagmos, y el 20% tuvo un despertar dificultoso, independientemente de la combinación utilizada.

El coste medio de los fármacos utilizados fue de 15,84 €/animal en el caso de la combinación TZX, y 4,60 €/animal en el caso de MKX.

### DISCUSIÓN

La sedación de los cerdos de experimentación se hace necesaria en el curso de muchos estudios, para realizar breves manipulaciones de severidad leve. Generalmente, se utilizan combinaciones farmacológicas, en cuya evaluación, la pérdida de reflejos y la evolución cardiorrespiratoria son los principales parámetros a evaluar, ya que el tiempo de ausencia de reflejos y la inalterabilidad cardiorrespiratoria son los principales objetivos de la sedación.

Los resultados del presente estudio mostraron que las dos combinaciones de fármacos probadas para la sedación de cerdos de granja jóvenes (tiletamina + zolacepam + xilacina, y ketamina + midazolam + xilacina) proporcionaron una sedación suficiente para permitir la realización de manipulaciones de corta duración y de severidad leve, tales como la extracción de muestras de sangre o de orina (ver Tabla 1).

Ambas combinaciones dieron resultados similares en cuanto a supresión del reflejo de estación y palpebral (ver Tabla 1). La ausencia de reflejo palpebral se asocia a plano anestésico, y en el presente estudio constatamos la pérdida de este reflejo en la mayor parte de los animales, pero con una duración muy variable. Aunque

no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de animales (posiblemente, por falta de tamaño de muestra), la combinación MKX produjo la ausencia de este reflejo en más animales (4/5), y con una duración más homogénea, suficiente para la realización de manipulaciones de, al menos, 10 minutos de duración (ver Tabla 1).

Otros autores han valorado previamente otras combinaciones similares, cuvos resultados fueron, en líneas generales, similares a los nuestros<sup>6</sup>, si bien a la vista de los datos (ver Tabla 1) parece observarse una mayor eficacia en los protocolos aplicados por nuestro grupo, ya que obtuvimos una pérdida del reflejo de estación más precoz y de mayor duración. Refiriéndonos también a este reflejo, otros autores han valorado combinaciones basadas en el uso de benzodiacepinas, alfa-2-adrenérgicos y opiáceos, obteniendo resultados similares a los del presente estudio cuando se utiliza morfina o butorfanol<sup>7</sup>, o menos eficaces, cuando el opiáceo era metadona8. En ninguno de los estudios mencionados se reportaron datos sobre el reflejo palpebral.

En la revisión bibliográfica, encontramos también autores que emplearon la alfaxalona en combinaciones sedantes<sup>9-11</sup> (ver Tabla 2), y, aparentemente, la pérdida del reflejo de estación fue más tardía que con las combinaciones probadas en el presente estudio. En estos estudios no hay datos sobre la duración de la pérdida de reflejos, ya que fueron sedaciones previas a anestesia general<sup>9-11</sup>. En el caso de la combinación de alfaxalona más midazolam<sup>11</sup>, se describieron frecuencias cardiacas elevadas (superiores a 170 lpm) y altas temperaturas (medias superiores a 38,9 °C; ver Tabla 2), en contraste con el resto de los estudios revisados, incluyendo el presente estudio.

	EST	UDIOS [	DE COM	BINACIO	ONES SI	DANTI	ES EN C	ERDOS	PREVIAS	A ANES	TESIA			
						GENER	AL							
Autores, año		Santos et	al., 2015	5	S	antos et	al., 201	3	Vul	lo et al., 2	019			
Fármacos	K	D	А	D		١	D	Α	AM					
		PÉRDIDA DE REFLEJOS												
Perdida reflejo de estación (min)	3,	11	3,43		5,0	03	3,	30		4,40				
					МО	NITORIZ	ACIÓN				_			
TIEMPOS (min)	5	10	5	10	5	10	5	10	10	15	20			
FC (Ipm)	133	137	127	135	130	129	128	138	172	174	178			
FR (rpm)	51	60	40	37	30	24	28	23	46	47	46			
SpO <sub>2</sub> (%)	95 95 96 95				96	96	95	96	94	94	94			
Temperatura corporal (°C)									39,4	38,9	38,9			

KD: Ketamina + Dexmetomidina AD: Alfaxalona + Dexmetomidina A: Alfaxalona DA: Diazepam + Alfaxalona

AM: Alfaxalona + Midazolam

Tabla 2.- Comparación de los datos obtenidos en estudios previos de distintos autores, en los que se empleó alfaxalona como componente de una combinación sedante previa anestesia general.

### CONCLUSIONES

Las dos combinaciones probadas en este trabajo dieron lugar a una sedación de entre 60 y 90 minutos, lo que permite hacer manipulaciones cortas y poco invasivas. Ambas mezclas produjeron una pronta pérdida del reflejo de estación, y en algunos casos también del palpebral, especialmente cuando se usó la mezcla de midazolam, ketamina y xilacina.

Los efectos cardiorrespiratorios asociados a la sedación fueron similares con ambas mezclas, y también parecidos a los reportados en estudios previos con otras combinaciones sedantes eficaces y seguras.

Con estos resultados, y la gran diferencia de coste, nuestro grupo se decantó por la combinación más económica compuesta por ketamina, midazolam y xilacina. No obstante, se tendrá siempre en cuenta que, en este caso, con las presentaciones comerciales disponibles, el volumen a administrar es 4 veces mayor, por lo que en determinados casos (por ejemplo, cerdos de gran tamaño) se emplea la combinación tiletamina, zolacepam y xilacina para disminuir el volumen y no provocar dolor.

- **BIBLIOGRAFÍA**
- Gonzalez L.M., Moeser A.J., and Blikslager A.T. Porcine models of digestive disease: the future of large animal translational research. Transl Res. 2015,166:12-27.
- Helke K.L., Ezel P.C., Duran-Struuck R. et al. Chapter 16 Biology and Diseases of Swine. In Laboratory Animal Medicine (Third Edition). Academic Press. 2015.
- 3. Swindle M.M., Makin A., Herron A.J. et al. Swine as models in biomedical research and toxicology testing. Vet. Pathol. 2012,49:344-56.
- 4. Kobayashi E., Hishikawa S., Teratani T. et al. The pig as a model for translational research: overview of porcine animal models at Jichi Medical University. Transplant. Res. 2012,1:8.
- Mikkelsen M.L.G., Ambrus R., Miles J.E. et al. Effect of propofol and remifentanil on cerebral perfusion and oxygenation in pigs: a systematic review. Acta Vet Scand. 2015, 58:42.
- Lu D-Z., Fan H-G., Wang H-B. et al. Effect of the addition of tramadol to a combination of tiletamine-zolazepam, and xylazine for anaesthesia of miniature pigs. Vet Rec. 2010,167:489-92.

- Lehmann H.S., Blache D., Drynan E. et al. Optimum Drug Combinations for the Sedation of Growing Boars Prior to Castration. Animals (Basel). 2017,7:61.
- 8. De Monte V., Staffieri F., Di Meo A., et al. Comparison of ketaminedexmedetomidine-methadone and Tiletamina-zolazepam-methadone combinations for short- term anaesthesia in domestig pigs. Vet J. 2015,205:364-8.
- Santos M., Torrent B., and Tendillo F.J. Effects of intramuscular alfaxalone alone or in combination with diazepam in swine. Vet Anaesth Analg. 2013.40:399-402.
- 10. Santos M., Torrent B., and Tendillo F.J. Effects of intramuscular dexmedetomidine in combination with ketamine or alfaxalone in swine. Vet Anaesth Analg. 2016,43:81-5.
- 11. Vullo C., Meligrama M., Tambella A.M. et al. Effects of intramuscular alfaxalone-Midazolam combination in pig. Acta Vet. Brno. 2019,88:187-

# Your global operating experts in lab animal diets.





As an ISO-certified company with over 50 years of experience we offer you standardized animal nutritional solutions and customized special diets.



Suministros para animalarios





# Dispositivos microfluídicos como nueva herramienta de cultivo celular in vitro

Sandra González Lana, Lara Pancorbo Lambán, Luis E. Serrano Ramón y Rosa M. Monge Prieto BEOnChip (Biomimetic Environment On Chip)

Palabras clave: remplazo, microfluidica, chip.

Los sistemas de cultivo celular son herramientas imprescindibles para la investigación básica, industrial, en estudios clínicos y búsqueda de nuevos fármacos. Durante más de un siglo, la placa de Petri ha sido el instrumento estrella para el cultivo celular *in vitro*. Aunque su primer uso en 1877 fue para el aislamiento y cultivo de microorganismos por su inventor, el bacteriólogo alemán Julius Richard Petri, con el tiempo se ha extendido a otros ámbitos de la biología y la medicina en múltiples formatos y materiales. Durante más de un siglo, estas placas han permitido estudiar el comportamiento celular y están detrás de grandes investigadores y aportaciones a la ciencia.

Sin embargo, el avance científico ha demostrado que el comportamiento de las células en estas placas no representa la realidad de un organismo vivo. Dicho de otro modo: la placa de Petri no es fiel al entorno natural de las células *in vivo*. Al cultivar células en una placa de vidrio o plástico, estamos omitiendo muchos estímulos del entorno que hacen a estas células ser y funcionar como realmente lo hacen.

Citando al filósofo español Ortega y Gasset, "yo soy yo y mi circunstancia", podríamos decir que "las células son ellas y su microentorno"; o lo que es lo mismo, se comportarán de una manera u otra dependiendo del ambiente en el que se encuentren, de manera que cuanto más mimético sea con el fisiológico, mejor podremos comprender su funcionamiento y actuar en consecuencia.

Es por esto que, en el desarrollo de nuevos modelos de cultivo celular que mimeticen el microambiente, una nueva generación de sistemas de cultivo celular está emergiendo.

Desde la última década se habla de dispositivos microfluídicos para cultivo celular. La microfluídica es la ciencia que estudia la manipulación de fluidos a microescala (de 10º a 10º litros) utilizando canales con dimensiones de milímetros y micrómetros. Aplicado al cultivo celular, se trata de dispositivos o chips con un conjunto de cámaras y canales que permitan alojar uno o varios tipos celulares de

manera organizada, al tiempo que la misma plataforma de cultivo permita al investigador aplicar diversos estímulos fisicoquímicos.

Esta es la labor de la empresa zaragozana BEOnChip, que bajo el lema *Biomimetic Environment On Chip* (entorno biomimético en chip), se dedica a diseñar y fabricar dispositivos para un cultivo celular *in vitro* más realista. Esta *spin-off* de la Universidad de Zaragoza está formada por un equipo multidisciplinar que aboga por la búsqueda de nuevos modelos de cultivo celular que arrojen resultados más fiables de los procesos biológicos; siendo uno de sus objetivos principales generar y ofrecer herramientas capaces de testar fármacos que permitan reducir tanto la experimentación animal, como los costes en tiempo y dinero, así como identificar nuevas terapias y biomarcadores clínicos y facilitar el desarrollo de vacunas.

Para ello, la experiencia del equipo en el campo de las microtecnologías, la microfluídica y el cultivo celular ha llevado al desarrollo y comercialización de cuatro dispositivos diferentes que abarcan un gran número de posibilidades: Be-Flow, Be-TransFlow, Be-DoubleFlow y Be-Gradient. Con un diseño innovador y un formato que permite su uso en las infraestructuras del laboratorio tradicional, estos chips presentan la posibilidad de personalizarlos según los requerimientos del investigador.

Sus aplicaciones varían, pudiendo simular el microentorno de tumores, vasos sanguíneos, intestino, hueso, riñón, piel y hasta corazón. Pero ¿cómo puede simularse un corazón/riñón/intestino/piel en un chip?

Haciendo uso de lo que se conoce como tecnología de órgano en chip (OoC del inglés *Organ on Chip*).

El conjunto de canales y compartimentos de un chip permite depositar de manera organizada materiales y proteínas específicas que simulen la matriz extracelular, permitiendo que las células se adhieran e interactúen entre sí. A continuación, se aplican estímulos

# **IN VITRO**

### **ANIMALES DE LABORATORIO**

OTOÑO 2020 / NÚMERO 87

como, por ejemplo, el flujo del medio de cultivo (este tratará de imitar el flujo de sangre a través de un vaso sanguíneo que irriga un tejido biológico). Ese flujo causa un estrés mecánico (shear stress) que tendrá un impacto directo por contacto con las células, e indirecto mediante la generación de gradientes de oxígeno y nutrientes que provocarán fenómenos como la migración o diferenciación celular. En el medio de cultivo en movimiento pueden incluirse desde fármacos hasta células del sistema inmune, pasando por microorganismos que ayuden a componer una microbiota. Así, combinando varios tipos celulares e implementando todos los estímulos químicos y físicos posibles, se genera un cultivo complejo que consigue simular la microarquitectura de un órgano o tejido creando unidades funcionales. Estas unidades funcionales pueden conectarse entre sí para imitar la interconexión de los órganos dentro un organismo, permitiendo analizar respuestas bioquímicas y fisiológicas complejas interconectadas, lo que nos lleva al concepto de cuerpo en chip (Body on Chip). Investigadores estadounidenses del Wyss Institute conectaron un chip de intestino con otro de hígado y riñón para evaluar el efecto que puede tener la nicotina mediante administración oral (chicles de nicotina). Tras su absorción en la pared intestinal y mediante el sistema circulatorio, es transportada al hígado donde se metaboliza, y posteriormente al riñón donde se excreta<sup>1</sup>.

El objetivo a largo plazo, de esta nueva corriente y de BEOnChip, es alcanzar la medicina personalizada; en la que, extrayendo células de un paciente y cultivándolas en un chip seamos capaces de diagnosticar, testar fármacos y aplicar tratamientos de manera precisa.

BEOnChip es la primera y única empresa española que desarrolla y comercializa la tecnología OoC. La filosofía de esta empresa es ajustarse y conectar con sus clientes, interesándose por sus necesidades y brindando un soporte técnico basado en la experiencia activa del equipo de I+D.

En España son varios los grupos que trabajan con la tecnología OoC. El grupo TME lab (*Tissue MicroEnvironment Lab*), liderado por el Dr. Luis Fernández, trabaja en el campo de la microfluídica y el desarrollo y fabricación de elementos de control como sensores para integrar en dispositivos. Se ocupan también del desarrollo de modelos de cultivo de diferentes órganos en chip, habiendo alcanzado un modelo de glioblastoma, uno de los más agresivos tumores cerebrales<sup>2,3</sup>. Por otro lado, cuentan con un equipo de simulación y modelado matemático encargado de establecer modelos que permitan una cuantificación y predicción de los procesos biológicos. El Grupo de Aplicaciones Biomédicas del Instituto de Microelectrónica de Barcelona (IMB-CNM) CSIC y del CIBER-BBN, liderado por la Dra. Rosa Villa en colaboración con otros grupos, ha desarrollado modelos robustos de hígado<sup>4</sup>, barrera hematoencefálica y hematorretiniana<sup>5</sup>.

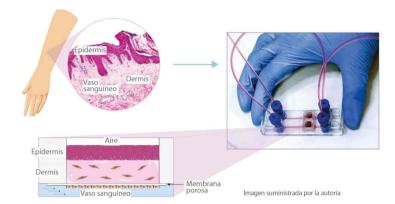


Figura 1.- Creación de un modelo de piel en el dispositivo microfluídico de cultivo celular Be-Transflow.

En la Figura 1 se muestra un ejemplo de cómo se puede crear un modelo de piel en el dispositivo microfluídico de cultivo celular Be-Transflow. Este consiste en un pocillo comunicado, a través de una membrana porosa biocompatible, con un canal microfluídico diseñado para la conexión a tubos y sistemas de flujo. En este dispositivo es posible recrear (de abajo a arriba) el vaso sanguíneo que irriga el tejido, tapizando la membrana del canal por su parte inferior con células endoteliales; la dermis, compuesta principalmente por colágeno y fibroblastos en un cultivo 3D con hidrogel; y la epidermis, con queratinocitos que crecen en estratos en condiciones de interfaz aire-líquido<sup>6</sup>.

### **BIBLIOGRAFÍA**

- 1. Herland, A., Maoz B.M., Das D., et al. Quantitative prediction of human pharmacokinetic responses to drugs via fluidically coupled vascularized organ chips. *Nat. Biomed. Eng.* 2020;4:421-36.
- 2. Ayuso, J.M., Virumbrares-Muñoz M., Lacueva A., et al. Development and characterization of a microfluidic model of the tumour microenvironment. Sci. Rep. 2016;6:1-16.
- 3. Virumbrales-Muñoz, M., Ayuso J.M., Lacueva A., et al. Enabling cell recovery from 3D cell culture microfluidic devices for tumour microenvironment biomarker profiling. Sci. Rep. 2019;9:1-14.
- Moya, A., Ortega-Ribera M., Guimerà X., et al. Online oxygen monitoring using integrated inkjet-printed sensors in a liver-on-a-chip system. Lab Chip. 2018;18:2023-35.
- Yeste, J., García-Ramírez M., Illa X., et al. A compartmentalized microfluidic chip with crisscross microgrooves and electrophysiological electrodes for modeling the blood-retinal barrier. Lab Chip. 2018;18:95-105
- Atlas de histología. Facultad de Medicina. Universidad de Zaragoza. http://wzar.unizar.es/acad/histologia/

# BIENESTAR ANIMAL

# Estudio comparativo de tres materiales utilizados como lecho en cubetas de ratones de laboratorio

### Iván Ortega-Saez¹ y Garikoitz Azkona Mendoza²

<sup>1</sup> Universitat de Barcelona (UB)

<sup>2</sup> Departamento de Procesos Psicológicos Básicos y su Desarrollo, Universidad del País Vasco/ Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)

Palabras clave: lecho, viruta, material.

### INTRODUCCIÓN

El material utilizado como lecho es un factor importante en la estabulación de los roedores. El lecho impide el contacto directo del animal con la cubeta y le permite el desarrollo de sus diferentes conductas naturales, como escarbar o hacer nidos. Además, el lecho permite la absorción de los orines y las heces, reduciendo el crecimiento bacteriano, que a su vez disminuye la producción de gases como el amoniaco (NH<sub>3</sub>) y el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), y la acumulación de toxinas bacterianas dañinas <sup>1,2</sup>. Se han descrito problemas respiratorios<sup>3</sup>, oculares<sup>4</sup> y dérmicos<sup>5</sup> en ratones derivados de concentraciones altas de NH<sub>3</sub> y CO<sub>2</sub> en las cubetas donde se alojan. La calidad del material utilizado como lecho debería de ser la mejor posible para evitar problemas en la salud de los animales.

En este estudio hemos analizado las concentraciones de  $\rm NH_3$  (ppm) y/o  $\rm CO_2$  (%) tras una y dos semanas de alojamiento de ratones en cubetas con chopo, abeto o celulosa como viruta. El objetivo fue el de determinar las posibles diferencias entre los materiales en su uso como lecho para el alojamiento de ratones de laboratorio.

### **MATERIALES Y METODOS**

### **Animales**

Ratones C57BL/6J (Janvier) de 7 semanas de edad y separados por sexo, se alojaron en grupos de 5 animales por cubeta (1145T; Tecniplast) en racks ventilados (70 renovaciones/hora), con agua y comida *ad libitum*. La sala se mantuvo con un ciclo de luz de 12 horas (luz: 07:00-19:00h) y un rango de temperatura de 20-24 °C y 40-70% de humedad relativa. La temperatura y la humedad relativa de la sala se registraron mediante el sistema de Control Ta VWR-Fourtec.

### Viruta

Se analizaron un total de 12 cubetas por tipo de muestra, 6 cubetas en las que se alojaron hembras y 6 con machos. En todas ellas se pusieron 800 cc de las siguientes virutas: Lignocel BK 8/15 (abeto), Lignocel Selectfine (chopo) y Arbocel (celulosa), todas ellas de la empresa Rettenmaier Ibérica S.L.

### Medidor de NH, y CO,

Mediante el aparato Dräger Accuro se tomaron medidas de  $NH_3$  y  $CO_2$  desde la entrada de la tetina de agua los días que duró el estudio (ver Figura 1). Las mediciones se realizaron a día 0, 7, 14 y 21. Se tomaron fotos para analizar el aspecto macroscópico de las cubetas.

Los resultados fueron analizados mediante el programa estadístico Graph Pad Prims. Los valores se muestran como media  $\pm$  SEM.



Figura 1.- Colocación del medidor Drägger en una cubeta 1145T.

# BIENESTAR ANIMAL

### **ANIMALES DE LABORATORIO**

OTOÑO 2020 / NÚMERO 87

### **RESULTADOS**

### Temperatura y Humedad

Durante el tiempo que duró el estudio (21 días) los valores de temperatura y humedad fueron constantes. No se observaron valores fuera de rango ni cambios bruscos. La temperatura media durante el estudio fue de  $22\pm0.1$  C° y la humedad relativa de  $58\pm0.9\%$  (ver Figura 2).

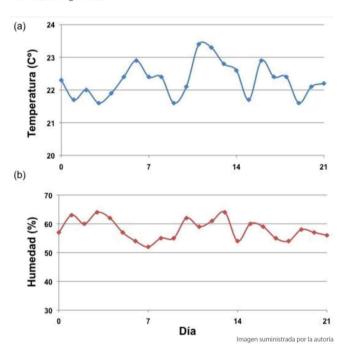
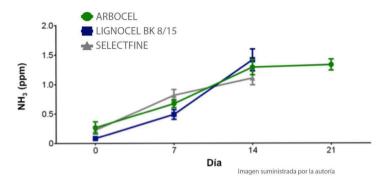


Figura 2.- Valores medios de (a) temperatura y (b) humedad relativa por cada día. Como se observa en la gráfica, la temperatura y la humedad relativa se mantuvieron dentro de los márgenes establecidos en nuestras instalaciones durante los 21 días que duró el experimento.

### Valores de NH,

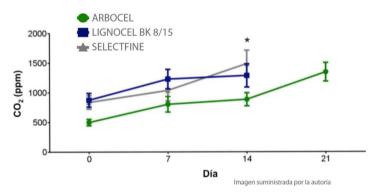
La gráfica muestra un incremento progresivo en función de los días en los valores de  $\rm NH_3$  en todas las virutas (ver Figura 3). No se observan diferencias significativas entre ellas. A día 14 los niveles promedio de  $\rm NH_3$  para abeto (Lignocel BK 8/15), chopo (Lignocel Selectfine) y celulosa (Arbocel) fueron de 1,4  $\pm$  0,2, 1,1  $\pm$  0,2 y 1,3  $\pm$  0,1 ppm, respectivamente. En vista de estos resultados, y de la buena apariencia en general, se optó por seguir el estudio una semana más con las cubetas con celulosa y los valores a día 21 fueron los mismos obtenidos a día 14, 1,3  $\pm$  0,1 ppm.



**Figura 3.-** Valores de NH $_3$  para cada una de las virutas utilizadas. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM.

### Valores de CO,

Los niveles de  $CO_2$  fueron de 1.285  $\pm$  196 (abeto), 1.487  $\pm$  226 (chopo) y 885  $\pm$  110 ppm (celulosa), siendo las diferencias estadísticamente significativas entre el chopo y la celulosa (Twoway ANOVA; p < 0,05). En vista de los valores más bajos de  $CO_2$  en las cubetas con viruta a base de celulosa se alargó el estudio una semana más. Los valores de  $CO_2$  a día 21 en estas cubetas fue de 1.345  $\pm$  157 ppm.



**Figura 4.-** Valores de  $CO_2$  para cada una de las virutas utilizadas. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM. \*p < 0,05.

### Estudio macroscópico

Si bien los parámetros estudiados se encuentran dentro de los rangos estándares, las cubetas con maderas muestran un aspecto muy sucio a las dos semanas, y es necesario cambiarlas. Sin embargo, el aspecto de las cubetas con celulosa a los 14 días permite prolongar su uso una semana más.

# **BIENESTAR ANIMAL**

Las fotos muestran que con el paso de los días las virutas se van entremezclando con las heces y orines de los animales siendo la viruta de celulosa la que mejor filtra estos desechos y mejor aspecto presenta de cara al cuidador e investigadores (ver Figura 5).



ımagen suministrada por la autori

Figura 5.- Fotografías a diferentes tiempos de las cubetas. En vista del aspecto que presentaban y los resultados de las mediciones se decidió alargar el estudio una semana más (21 días) en las cubetas con celulosa.

### DISCUSIÓN

En este estudio hemos analizado los niveles de  $NH_3$  y  $CO_2$  en cubetas con tres materiales diferentes como lecho: abeto, chopo y celulosa. Las renovaciones por hora de aire fueron de 70, y se cambiaban cada 15 días, siguiendo los consejos publicados con anterioridad<sup>6</sup>. Los valores de  $NH_3$  en todas las condiciones experimentales aumentan a lo largo del tiempo, pero en todos los casos es muy inferior al límite de 25 ppm establecido como máximo estandar<sup>7</sup>. En cuanto a los niveles de  $CO_2$  no hay recomendaciones oficiales sobre los límites, aunque algunos autores han establecido un límite de 15.000 ppm para condiciones experimentales<sup>8</sup>. Nuestros datos muestran que los valores máximos son menores de 1.500 ppm, y de hecho es la celulosa la que muestra los datos más bajos.

### CONCLUSIÓN

Teniendo en cuenta que no hay grandes variaciones ni de  $NH_3$  ni de  $CO_2$  entre virutas, la elección se podría hacer en base al aspecto visual. En este sentido, la celulosa puede ser una alternativa a la madera como lecho para ratones de laboratorio, permitiendo su uso, en las condiciones estudiadas, por lo menos durante tres semanas.

### **AGRADECIMIENTOS**

Quisiéramos agradecer a Rettenmaier Ibérica® y concretamente a Elena Álvarez por la aportación de los diferentes lechos, el medidor Dräger Accuro® y por la ayuda prestada para resolver cualquier tipo de duda.

### **BIBLIOGRAFÍA**

- 1. Raynor T.H., Steinhagen W.H., and Hamm T.E. Differences in the microenvironment of a polycarbonate caging system: bedding vs raised wire floors. Lab Anim. 1983;17:85-9.
- Perkins S.E. and Lipman N.S. Characterization and quantification of microenvironmental contaminants in isolator cages with a variety of contact beddings. ContempTop Lab Anim Sci. 1995;34:93-8.
- 3. Serrano L.J. Carbon dioxide and ammonia in mouse cages: effect of cage covers, population, and activity. Lab Anim Sci.1971;21:75-85.
- 4. Van Winkle T.J. and Balk M.W. Spontaneous corneal opacities in laboratory mice. Lab Anim Sci. 1986;36:248-55.
- 5. Berg R.W., Buckingham K.W., and Stewart R.L. *Etiologic factors in diaper dermatitis: the role of urine*. Pediatr Dermatol. 1986;3:102-6.
- Reeb C., Jones R., Bearg D. et al. Microenvironment in Ventilated Animal Cages with Differing Ventilation Rates, Mice Populations, and Frequency of Bedding Changes. Contemp Top Lab Anim Sci. 1998;37:43-9.
- 7. Ferrecchia C.E., Jensen K., and Van Andel R. *Intracage ammonia levels in static and individually ventilated cages housing C57BL/6 mice on 4 bedding substrates*. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2014;53:146-51.
- 8. Silverman J., Bays D.W., Cooper S.F., et al. Ammonia and carbon dioxide concentrations in disposable and reusable ventilated mouse cages. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2008;47:57-62.





# ¡LA GENTE HABLA DE NEXGEN!

La gente habla de NexGen, ¡y lo que cuentan es maravilloso! Cuando comercializamos NexGen, nuestro objetivo era garantizar que se tratara del sistema de jaulas ventiladas individualmente (IVC) más ligero, rentable y fácil de usar del sector de los sistemas de laboratorio automatizados (LAS). Y por los comentarios que nos llegan, ¡lo conseguimos! De hecho, todo este buen feedback es el motivo por el cual llamamos "Easy IVC" a NexGen.



# Histología del intestino e hígado de peces de acuicultura. Comparación con pez cebra

Ana Isabel Nieto<sup>1</sup>, Ana M. Santos<sup>2</sup> y Fco. Javier Alarcón<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Experimentación Animal, Centro de Instrumentación Científica, Universidad de Granada <sup>2</sup>Servicio de Microscopía, Unidad MFC, Centro de Instrumentación Científica, Universidad de Granada <sup>3</sup>Dpto. Biología y Geología, Escuela Superior de Ingeniería, Universidad de Almería

Palabras clave: acuicultura, sistema digestivo.

### INTRODUCCIÓN

Según el informe sobre el uso de animales en experimentación y otros fines científicos publicado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) a finales de 2019<sup>1</sup>, el uso de lo que se recoge como "otros peces" supone el 10,64% de los animales de experimentación utilizados durante el año 2018. Por tanto, según este informe, este grupo – un tanto heterogéneo de especies – sería el segundo grupo de especies más utilizadas después de los ratones, por delante de aves de corral, ratas y peces cebra. En el informe del MAPA se detallan cuáles son esos otros peces y, claramente, los más utilizados son las especies que ya están siendo usadas comercialmente o las que se están tratando de criar en cautividad para ese fin, como: el rodaballo (Scophthalmus maximus), la dorada (Sparus aurata), la lubina (Dicentrarchus labrax) o el atún (Thunnus thynnus).

En el caso de los peces, hay que considerar, también, que en las estadísticas se incluyen las larvas autónomas para su alimentación (lo que incrementa su número), pero en el caso de los peces de importancia en acuicultura, se emplean animales ya adultos para los experimentos en la mayoría de los casos.

Para los que trabajamos con los modelos de experimentación que consideramos "convencionales", el uso tan elevado de estos "otros animales" como las aves y los peces nos puede resultar sorprendente, pero si hacemos una búsqueda de los proyectos de investigación que los utilizan, veremos que son muy numerosos y en campos también muy variados. Muchos de los proyectos están relacionados con la genética, la nutrición o ambas, para conseguir una mejora de la reproducción, del crecimiento, sanitaria o incluso de bienestar animal; como, por ejemplo, para atenuar mediante el uso de determinados piensos las situaciones de estrés durante la cría.

A la Universidad de Granada nos han llegado muestras de dorada, lubina y rodaballo, procedentes de la Universidad de Almería. Las especies mencionadas tienen hábitats y hábitos alimentarios muy diferentes, pero todas ellas son especies utilizadas en acuicultura y con un nexo común: forman parte de estudios orientados a evaluar el efecto de aditivos/ingredientes alimentarios en el sistema digestivo de los peces; fundamentalmente, muestras de intestino e hígado.

Nos centramos en esos dos órganos porque la investigación que se desarrolla en ellos está orientada a diversos aspectos de su nutrición y alimentación; sobre todo al desarrollo de piensos para especies de acuicultura y a valorar los efectos que pueden tener diferentes ingredientes/aditivos. En nuestro caso, además, hemos comparado estas muestras con las que tenemos de peces cebra, que es el modelo animal con el que trabajan varios grupos de nuestra universidad.

La alimentación de los peces de acuicultura –especies marinas sobre todo- ha dependido durante mucho tiempo de la pesca extractiva para la obtención de harinas y aceites de pescado con los que se elaboraban los piensos. El agotamiento de los caladeros, el incremento de la demanda y del precio de estos insumos han generado que cada vez se usen menos estos ingredientes y se hayan tenido que introducir otros ingredientes alternativos. Esto es factible porque se sustituyen unos nutrientes por otros, pero no es menos cierto que la mucosa intestinal se resiente cuando estas sustituciones son muy drásticas, o cuando se usan determinados ingredientes para alimentarlos. En algunas especies se ha pasado de usar un 40% de harina de pescado a usar un 5%, lo que genera cambios estructurales y fisiológicos notables en el intestino, con los correspondientes problemas que ello acarrea. La alimentación de los peces es algo que continuamente se está innovando con nuevos ingredientes y

### **ANIMALES DE LABORATORIO**

OTOÑO 2020 / NÚMERO 87

aditivos, y por ello es clave ver cómo se comportan los animales frente al cambio en la formulación y diseño de las dietas. Las fórmulas de ingredientes de hace 10 años nada tienen que ver con las que se usan ahora mismo y en 10 años serán totalmente diferentes a las actuales.

En este contexto, el sistema digestivo es una pieza fundamental en la nutrición del pez por ser el lugar en el que se digiere el alimento y desde el que se absorben los nutrientes para su posterior uso sistémico. Por ello se estudia el aparato digestivo, (fundamentalmente el intestino) desde una doble perspectiva: i) en relación a su integridad estructural, y ii) en lo referente a su función.

Respecto a lo primero, las imágenes de microscopía óptica se utilizan para analizar la estructura y realizar una serie de mediciones que nos pueden aportar información de si todo está dentro de la normalidad o de si hay indicios de que algo puede ir mal; por ejemplo, fenómenos de inflamación o esteatosis intestinal ocasionados por el uso de ciertos ingredientes. Los parámetros que se miden son la longitud de las vellosidades (un aumento nos puede indicar mayor superficie de absorción), el espesor de la lámina propia (un aumento puede indicar fenómenos pro-inflamatorios), el número de leucocitos infiltrados en la lámina propia, el número de células caliciformes y/o la anchura de la vellosidad. Todos estos datos proporcionan información acerca de si hay alteraciones estructurales o no. Del mismo modo que se pueden utilizar para ver si algo marcha mal, también se pueden usar para ver si hay un efecto positivo, sobre todo cuando se utilizan ciertos aditivos/ingredientes cuya función es mejorar el estado de la mucosa intestinal.

El estudio histológico, junto con el que se hace desde el punto de vista funcional —cuantificando diferentes enzimas intestinales y la microbiota—, nos permite indagar el estado del sistema digestivo de los animales. Es importante destacar que el intestino no sólo es una superficie que tiene un papel clave en la absorción de los nutrientes, sino que de su estado también va a depender el estado inmunológico del pez; de hecho, el intestino se considera un órgano inmunológico en estos animales. Por eso, los conceptos nutrición e inmunidad van de la mano en acuicultura. En la práctica acuícola hoy en día, se tiene muy claro que una mucosa intestinal en buen estado es garantía de buen crecimiento y también de una menor incidencia de patologías. El acuicultor consigue que sus peces crezcan bien y que no haya que utilizar tratamientos para curar patologías, las cuáles tienen mayor incidencia cuando la mucosa intestinal está debilitada.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras de intestino e hígado procedentes de tres especies de peces de interés comercial (dorada, lubina, rodaballo) y una de interés científico (pez cebra) se procesaron de forma rutinaria para hacer tinciones histológicas. Todas ellas fueron fijadas en formalina al 10% y en el caso del pez cebra (como se procesa completo) se descalcificó previamente a su procesamiento en parafina. Se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina y de azul Alcián, este último para el tejido intestinal.

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### Intestino

En el intestino de todas las especies analizadas no se observaron diferencias entre el intestino delgado y el grueso, aunque sí se puede establecer una diferencia entre la parte anterior y la parte posterior; una disminución de la altura de las vellosidades hacia la zona posterior y el consiguiente adelgazamiento de la pared (ver Figura 1). Es importante, si se va a hacer un estudio histomorfométrico midiendo la altura y el grosor de las vellosidades, que se seleccione siempre el mismo punto de toma de la muestra para evitar que las variaciones anatómicas normales se achaquen incorrectamente a los tratamientos.

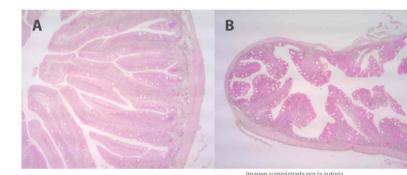


Figura 1.- Intestino anterior y posterior: Obsérvese la mayor altura de las vellosidades intestinales en la parte anterior (A) respecto a la posterior (B). Tinción Hematoxilina-Eosina (4x).

La pared intestinal es similar a la de otros vertebrados y está constituida (desde la luz al exterior) por una capa mucosa con epitelio y lámina propia, una capa submucosa, una capa muscular bastante gruesa y formada por una capa circular interna y otra longitudinal externa, y una capa serosa más externa<sup>2,3</sup>.

La capa mucosa forma vellosidades que se encuentran recubiertas por células epiteliales asentadas sobre un tejido conjuntivo con capilares sanguíneos y vasos linfáticos. El epitelio intestinal es de tipo columnar y presenta microvellosidades en la parte apical (el denominado ribete en cepillo de los enterocitos, las células epiteliales del intestino²). Este epitelio tiene dos tipos celulares principales: los enterocitos, encargados de la absorción gracias a la presencia de microvellosidades en su borde apical, y las células caliciformes, glándulas unicelulares encargadas de la secreción mucosa³. Estas últimas son las que aparecen teñidas de color azulado con la tinción de azul Alcián (ver Figura 2). Cabe destacar que, en el caso del intestino de rodaballo, estas células no se tiñen con esta técnica. Este hecho puede ser debido a la diferente apetencia tintorial de los mucopolisacáridos presentes en las células caliciformes de esta especie en concreto.

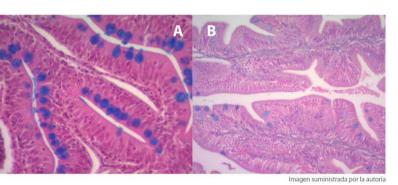


Figura 2.- Intestinos teñidos con Hematoxilina-Eosina y azul Alcián; este último colorante pone de manifiesto las células caliciformes del epitelio de la mucosa intestinal. A. Intestino de pez cebra (20x). B. Intestino de lubina (10x).

En la parte anterior del intestino se pueden observar, en ocasiones, pliegues de las vellosidades (ver Figura 3A). Su función podría ser la de retrasar la velocidad del movimiento peristáltico intestinal y permitir una retención parcial de la comida semidigerida, lo que aumentaría la efectividad en la digestión y absorción. En los peces no hay verdadera presencia de glándulas de Lieberkühn².

La lámina propia está constituida por un tejido conjuntivo laxo dispuesto entre las vellosidades y formado por fibroblastos, fibras de colágeno, linfocitos y vasos. También puede contener alguna fibra muscular lisa que es más difícil de observar con la tinción de Hematoxilina-Eosina<sup>3</sup>.

La túnica o capa submucosa está formada por un tejido conjuntivo con numerosos vasos sanguíneos (ver Figura 3B). En esta capa y en la lámina propia, sorprende encontrar en lubinas, doradas y rodaballos la presencia de unas células que contienen unos gránulos intensamente eosinófilos en el citoplasma y que pueden llegar a ser muy numerosas (ver Figura 3C). Estas células tienen una función similar a los mastocitos de mamíferos, contienen péptidos antimicrobianos cuya degranulación aumenta la permeabilidad vascular y la adhesión de los neutrófilos, por lo que jugarían un papel importante en la inmunidad innata y la inflamación<sup>3</sup>. Por otro lado, junto con estas células también se observa una cantidad variable de tejido linfoide (ver Figura 3D).

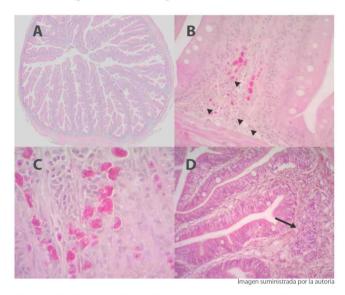


Figura 3.- A. Vista panorámica de una sección transversal de intestino de lubina (barra de escala 200 μm). B. Detalle de una vellosidad intestinal con epitelio a ambos lados delimitando la submucosa, donde se pueden observar vasos sanguíneos (puntas de flechas) (20x). C. Detalle de la submucosa a mayor aumento, donde se observan las células de gránulos eosinófilos, con gran afinidad por la eosina (40x). D. Acúmulo de tejido linfoide en la submucosa intestinal de dorada (flecha, 10x). Tinciones: A, Azul Alcián y Hematoxilina-Eosina. B-D, Hematoxilina-Eosina.

### Hígado

En el parénquima hepático de todos los peces analizados no se observa una organización en lóbulos, de manera que las venas centrolobulillares aparecen diseminadas al azar por el órgano. En todos los casos, los hepatocitos tienen una forma poliédrica con grandes núcleos con nucléolos muy evidentes que se suelen encontrar localizados a nivel central.

Los hepatocitos de los peces cebra presentan dimorfismo sexual. Las hembras reproductoras tienen el citoplasma intensamente basófilo debido a la producción de vitelogenina (una fosfolipoglicoproteína que forma parte del huevo). En los machos, esta basofilia es significativamente menor<sup>4</sup>, probablemente sea similar en hembras que no están poniendo huevos. El hígado del

### **ANIMALES DE LABORATORIO**

OTOÑO 2020 / NÚMERO 87

pez cebra tiene pocas arteriolas y no posee células de Kupffer<sup>4</sup> (ver Figura 4A).

En los peces de acuicultura analizados, la mayoría de los hígados presentan hepatocitos con un desplazamiento de los núcleos hacia la periferia celular, por la presencia de vacuolas claras en el citoplasma que suelen corresponderse con acúmulos de lípidos. Otras vacuolas más pequeñas y menos definidas podrían ser depósitos de glucógeno, que también son frecuentes en peces de acuicultura<sup>5</sup>. El aumento o disminución de estos depósitos permite a estos animales tener reservas para cubrir sus necesidades metabólicas. Esta es también una de las variables que se estudia cuando se hace análisis de diferentes dietas administradas a especies comerciales. El acúmulo de grasa a nivel hepático (esteatosis) no debería comprometer la funcionalidad de este órgano (ver Figuras 4B y 4C).

El sistema biliar está formado por canalículos intercelulares que se anastomosan para formar conductos tapizados de un epitelio de células cuboidales y rodeado de tejido conjuntivo (ver Figura 4D).

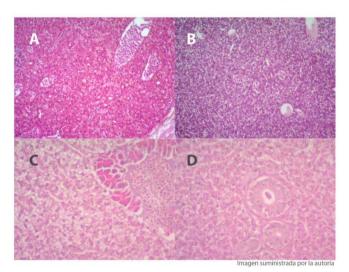


Figura 4.- A. Hígado de pez cebra macho (10x). B. Hígado de pez cebra hembra (10x). Se puede observar fácilmente una mayor basofilia en el hígado de la hembra. C. Hepatopáncreas de dorada (20x). Los hepatocitos acumulan vacuolas de grasa en el citoplasma. D. Conductos biliares en el hígado de la dorada (20x). Tinción A-D. Hematoxilina-Eosina.

En el caso de los peces cebra, el páncreas aparece extendido de forma difusa a lo largo del intestino (ver Figura 5A). Los conductos pancreáticos están formados por un epitelio, cuboidal o columnar según su localización, rodeado de colágeno y fibras elásticas<sup>4</sup>. Sin embargo, en los hígados de doradas y lubinas encontramos islotes de páncreas exocrino distribuidos por el parénquima hepático. En este caso, el hígado de estas especies se denomina hepatopáncreas. Esta estructura se genera durante el desarrollo, cuando el tejido pancreático crece alrededor de la vena porta; posteriormente, tanto la vena como el tejido pancreático penetran en el parénquima hepático (ver Figura 5B).

Las células excretoras se organizan en grupos, observándose dos tipos de células: las centroacinares y las células típicas del acino (ver Figura 5C). Las primeras son poliédricas, con su porción basal sobre la rama de la vena porta y la zona apical hacia la luz del acino. Las células típicas del acino son también poliédricas y se organizan en grupos para formar los acinos pancreáticos, con una luz central para excretar las enzimas<sup>6</sup>. La parte basal de las células es basófila, mientras que la apical es intensamente eosinófila al contener principalmente los gránulos de zimógeno para la digestión de los compuestos de la dieta. Los núcleos suelen estar localizados en una porción basal con nucléolos muy marcados. Entre las células acinares y, especialmente, en la parte más externa de los acinos, se observan unas células redondeadas y ovales que están relacionadas con fenómenos de inmunidad celular. Son células migrantes que se encuentran en muchos otros órganos como corazón, riñón, branquias o intestino<sup>6</sup>.

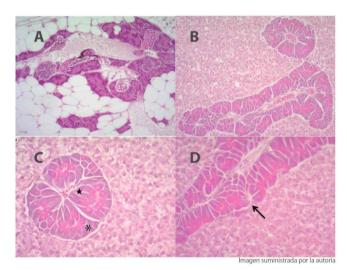


Figura 5.- A. Páncreas difuso de pez cebra (10x). B-D. Hepatopáncreas de dorada. B. Pueden observarse dos regiones de páncreas exocrino dentro del parénquima hepático (10x). C. Detalle de una de las porciones de páncreas exocrino (20x); se observan las células centroacinares (estrella negra) y las células redondeadas en la parte externa del acino (asterisco). D. La flecha señala una de las células redondas relacionadas con la inmunidad de los peces (20x) que también se observan en la imagen C. Tinción A-D. Hematoxilina-Eosina.

### CONCLUSIÓN

El estudio histológico del aparato digestivo y sus glándulas asociadas tiene un gran interés en el pez cebra por sus aplicaciones como modelo animal en el campo de la investigación básica, pero adquiere aún mayor importancia en las especies de peces con interés comercial en acuicultura. Sus cambios, especialmente en su estructura general y en la altura y el grosor de las vellosidades con diferentes tipos de dietas, están relacionados de forma directa tanto con un mayor aprovechamiento metabólico de dichas dietas, como con un mejor estado inmunológico y una mayor defensa frente a las enfermedades.

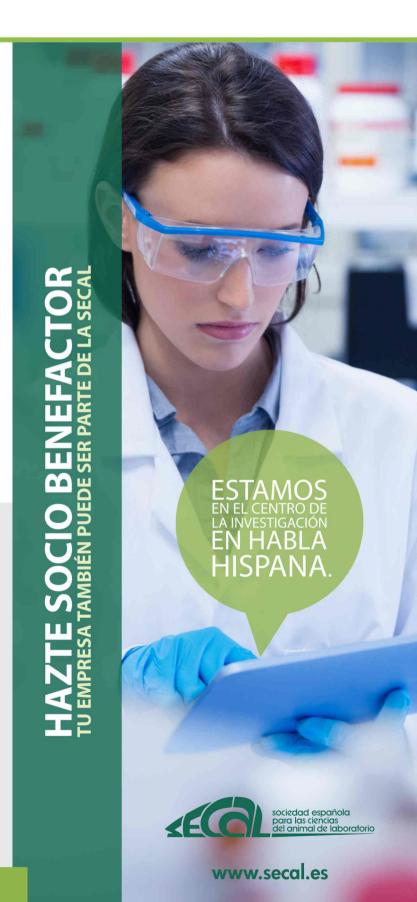
Por otro lado, el estudio del estado del hígado también permite conocer el aprovechamiento de los componentes nutritivos, siempre que los cambios de formulación en las nuevas dietas no provoquen un aumento patológico de los acúmulos que ponga en peligro la salud de los animales.

### **AGRADECIMIENTOS**

Los autores agradecen a los proyectos GREEN4FEED-Junta de Andalucía, ALQUABIOTIC-CDTI FEDER-INNTERCONECTA 2018 y ALGADIET-II-Fundación Biodiversidad la cesión de las muestras biológicas de dorada, lubina y rodaballo, respectivamente.

### **BIBLIOGRAFÍA**

- https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-ymercados-ganaderos/20191105informeart40rd53\_2013\_tcm30-520625.pdf
- 2. Genten F., Terwinghe E., and Danguy A. *Digestive System*. In: Atlas of fish histology. Science Publisher. 75. 2009.
- 3. Mokhtar D.M. *The digestive system*. In: Fish histology: from cells to organs.CRC Press. Apple Academic Press, Canadá. 108. 2017.
- 4. Menke A.L., Spitsbergen J.M., Wolterbeek P.M., et al. Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. Toxicologic Pathology. 2011,39:759-75.
- 5. Genten F., Terwinghe E., and Danguy A. *Glands associated with gastrointestinal tract*. In: Atlas of fish histology. Science Publisher. 92. 2009.
- Mokhtar D.M. Glands associated with digestive tract. In: Fish histology: from cells to organs. CRC Press. Apple Academic Press, Canadá. 174. 2017



C/ Laguna del Marquesado 14, Nave 1

**28021 MADRID** 

Teléfono: 91 710 95 47 /Fax: 91 796 65 52

E-mail: steriltech@steriltech.net

www.steriltech.net



### INSTRUMENTACIÓN E INSTALACIONES CIENTÍFICAS



Sistemas de descontaminación mediante peróxido de hidrógeno vaporizado registrado por la EPA y compatible con BPR, para proporcionar una reducción de patógenos de 6-Log, consistente y compatible con GMP para todos sus equipos y espacios.



### SAS Biológico

Con GVPH L - 4 de Bioquell se consigue una reducción de patógenos de 6Llog en todas las superficies de la cámara y de la carga.

### **SAS Ventilado**

Diferentes dimensiones según necesidad de la instalación con KIT de conexión a GVPH L-4 de Bioquell.

### **Bioquell ProteQ**

Descontaminación rápida y efectiva de salas. Móvil, escalable y compatible con tecnología de comunicación inalámbrica.

### **Bioquell BQ50**

Generador móvil y robusto. Resultados automáticos, rápidos y probados.



**Bioquell L-4** 

Generador de VPH móvil. Ideal para salas, aisladores, RABS, cabinas, etc.



**Bioquell IG-2** 

Solución integrada con su equipo y proceso operativo.



**Bioquell SeQure** 

Sistema fijo montado en pared.



**Asilador Qube** 

Espacio de trabajo aséptico y personalizable **GPHV** con integrado.













**MMM Group** 

bmt@bmtiberia.es www.bmtiberia.es











# Mantenimiento de la actividad de RELY+ON<sup>TM</sup> VIRKON<sup>TM</sup> para la descontaminación de superficies de instalaciones de animales

Pascual Álvarez G.¹, Garrido Velayos D.², Mengibar Vallejo M.P.³, y de Miguel Casas M.P.³

¹ Jefe del Servicio de Seguridad Biológica, Centro de Investigación en Sanidad Ánimal, INIÁ ² Jefe de Equipo de Seguridad Biológica, TRAGSATEC ³ Técnicos de Seguridad Biológica, TRAGSATEC

Palabras clave: biocidas, Virkon, estabilidad.

### **RESUMEN**

El presente estudio muestra el comportamiento en el tiempo del producto RELY+ON™ VIRKON™ al 2%, cuando es sometido a diferentes temperaturas, rangos de iluminación y cargas orgánicas, y comprobar cómo los posibles cambios afectan a su acción bio-descontaminante o biocida.

Con el fin de prevenir o eliminar la presencia de agentes biológicos patógenos, su estabilidad resulta fundamental para una eficaz aplicación en instalaciones de cualquier tipo.

### INTRODUCCIÓN

Los estudios de estabilidad de un biocida se realizan para establecer, garantizar y asegurar su actividad en un tiempo determinado, bajo la influencia de diferentes factores ambientales físicos (temperatura e iluminación), químicos (pH) u otros (presencia de materia orgánica). En todo caso, el estatus de limpieza previo del material empleado debe tomarse siempre en consideración con el fin de garantizar al máximo la acción biocida en su espectro de actuación.

### **OBJETIVO**

Determinar el mantenimiento o disminución de la eficacia en el tiempo del bio-descontaminante Rely+On™Virkon™ cuando es sometido a la influencia de factores medioambientales; de forma que se mantenga una confianza en su actividad dentro de un rango de seguridad y que este conocimiento pueda ser utilizado como herramienta de control del virus de la peste porcina africana. El presente estudio se desarrolla entre los meses de abril de 2018 y mayo de 2019.

### **MATERIAL UTILIZADO**

- RELY+ON™ VIRKON™. Formato sólido en polvo en contenedor de 5 kg. Lote: 1708BA0247, caducidad 08/2020.
- 2 baños termostáticos P-Selecta.
- 1 frigorífico Liebherr Premium Nofrost.
- 2 estufas (P-Selecta Rotabit). Cualificación térmica vigente.
- Balanza de precisión (Kern, modelo 572). Calibración interna vigente.
- Pipetas Pasteur y 25 botes de cristal (10/20 transparentes y 5 topacios).
- Medidor multiparamétrico de pH, temperatura y conductividad (Hanna Instruments, modelo HI991300).
   Calibración externa vigente.
- Luxómetro (Testo, modelo 545 Lux fc.). Certificado de calibración vigente.
- Cabina de Seguridad Biológica (Telstar Biostar Plus 3S).
   Cualificación vigente.
- Incubador Nuaire Us Autoflow. Cualificación térmica y de gases vigente.

### **METODOLOGÍA**

### Prueba 1

El ensayo se realizó, durante 5 días, en una estancia con iluminación natural a diferentes temperaturas, en ausencia o en contacto con el aire exterior.

Se tomaron 15 frascos de vidrio transparente, divididos en 5 lotes identificados como "A, B, C, D y E", sometidos a diferentes temperaturas (verTabla 1): A.4°C; B.22°C; C.30°C; D.40°C; y E.50°C.





OTOÑO 2020 / NÚMERO 87

Cada lote cuenta con 3 réplicas en contenedores numerados del 1 al 3 según el siguiente criterio: 1) ausencia de tapón, 2) presencia de tapón, y 3) control, presencia de tapón y con envoltura exterior de papel de aluminio.

Se preparan los 15 frascos con 500 ml de agua de grifo (procedente del Canal de Isabel II, a  $21^{\circ}\text{C}$  y con pH entre 6,87-7,23) y 10 g de RELY+ON<sup>TM</sup> VIRKON<sup>TM</sup> (mezcla al  $2^{\circ}$ ).

Se monitoriza pH, temperatura, iluminación y un estudio organoléptico (verTabla 2).

### Prueba 2

El proceso se desarrolla de igual forma que en la prueba 1, pero en una estancia sin iluminación natural y sometido a luz artificial ininterrumpida durante los 5 días de ensayo (ver Tablas 3 y 4).

### Prueba 3

Se ensayan, durante 5 días, diferentes cantidades crecientes de materia orgánica (MO) como interferente de actividad, a dos temperaturas (22°C y 30°C), controlando el pH (ver Tablas 5 y 6) y verificando presencia o ausencia de crecimiento mediante cultivo y conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) en placas de Petri con Triptiso y Agar (TSA) (ver Tabla 7). No se realizan pruebas organolépticas.

El agua de partida presenta una temperatura de 19°C y un pH entre 6,83 y 8,32. Los lotes se organizan en función de la materia orgánica añadida:

- 22°C: A. 25 g; B. 50 g; C. 75 g; y D. 100 g.
- 30°C: E. 25 g; F. 50 g; G. 75 g; y H. 100.

### Prueba 4

En base a los resultados obtenidos en la prueba 3, se descartan datos y se trabaja con 25 g y 50 g de materia orgánica, durante 5 días, a temperaturas de 22°C y 30°C (ver Tablas 8 y 9).

Se realiza, diariamente, un cultivo de ensayo de 0,5 ml en placas TSA (6 muestras: 30 placas) (ver Tabla 10). El agua de partida tiene un pH de 7,50-7,80 y temperatura de  $24^{\circ}$ C.

- Lote A (22°C): A1. sin MO; A2. 25 g de MO; y A3. 50 g de MO.
- Lote B (30°C): B1. sin MO; B2. 25 g de MO; y B3. 50 g de MO.

### Prueba 5

Repetición de ensayos de prueba 4 (ver Tablas 11, 12 y 13) a temperatura de agua 8°C y pH entre pH 8,80-8,93.

### Prueba 6

Repetición de ensayos de pruebas 4 y 5. Temperatura de agua 21,5°C y pH entre 8,80-8,96 (ver Tablas 14 y 15).

**Tabla 1.-** Variación de pH a distintas temperaturas (Ta), iluminación natural variable y contacto con aire exterior: (1) frasco abierto; (2) frasco cerrado; (3) frasco cerrado y recubierto con aluminio.

	LOTE	n	LUN	IES	MAR	TES	MIÉRO	OLES	JUE	VES	VIE	RNES	V final
	LOTE		рН	lux	рН	lux	pН	lux	pН	lux	pН	lux	(ml)
		A1	1,95	0	2,04	0	2,13	0	2,07	0	2,13	0	500
4 °C	Α	A2	1,86	0	2,05	0	1,97	0	1,97	0	2,12	0	500
		А3	1,87	0	2,06	0	1,99	0	2,02	0	2,08	0	500
		B1	1,84	330	2,04	700	2,05	698	1,98	367	2,04	517	500
22°C	В	B2	183	330	2,06	700	2,07	698	1,93	367	2,05	517	500
		В3	2,6	330	2,55	700	2,21	698	2,04	367	2,11	517	500
(J)		C1	1,87	330	2,14	595	2,06	595	1,99	565	2,1	370	500
30°C	С	C2	1,8	330	2,08	595	1,98	595	1,94	565	2,07	370	500
		C3	1,76	330	2,07	595	1,97	595	1,93	565	2,06	370	500
		D1	1,77	23	2,14	50	2	42	1,9	38	1,96	43	425
40°C	D	D2	180	23	2,08	50	1,99	42	1,87	38	2	43	500
,		D3	1,75	23	2,07	50	1,98	42	1,9	38	2,02	43	500
		E1	1,73	330	1,99	642	1,98	573	1,94	723	2,01	1020	425
20°C		E2	1,71	330	2,15	642	1,95	573	1,93	723	2	1020	500
		E3	1,69	330	2,17	642	1,99	573	1,94	723	2,01	1020	500



### **RESULTADOS**

### Prueba 1

Semana del 16-20/04/2018

	LUNES	MARTES	MIÉRCOLES	JUEVES	VIERNES
Cambio de color	-	A, D, E	A, D, E	A, D, E	A, D, E
Líquido homogéneo	-	B, C, D, E			
Partículas / Precipitación	-	А	А	А	А
Sedimentación	-	Α	А	Α	А
Olor	-	E	Е	E, D	D
Separación de fases	-		А	А	Α

**Tabla 2.-**Estudio Organoléptico de la prueba 1.

### Prueba 2

Semana del 7-11/05/2018

Tabla 3.-Variación semanal de pH a distintas temperaturas y nivel de iluminación artificial en lux: (1) frasco abierto; (2) frasco cerrado; (3) frasco cerrado y recubierto con aluminio.

	LOTE		LUN	IES	MAR	TES	MIÉRO	OLES	JUE	VES	VIER	NES	V final
	LOTE		рН	lux	pН	lux	pН	lux	pН	lux	pН	lux	(ml)
		A1	3,16	0	2,06	0	1,93	0	1,91	0	1,93	0	500
4 °C	Α	A2	2,65	0	2,04	0	2,03	0	1,99	0	1,93	0	500
		А3	2,85	0	2,05	0	2,05	0	1,95	0	1,87	0	500
		B1	2,67	20	1,95	24	2,23	32	1,88	27	1,95	23	500
22°C	В	B2	2,28	20	1,93	24	2,14	32	1,99	27	1,96	23	500
(4)		В3	2,28	20	1,97	24	2,12	32	2,01	27	1,94	23	500
		C1	2,27	15	2,06	18	2,05	23	2,04	11	2,06	17	500
30°C	С	C2	2,9	15	2,07	18	2,21	23	1,96	11	2	17	500
m		C3	3,09	15	2,01	18	2,11	23	1,95	11	1,98	17	500
		D1	2,98	0	2	0	1,99	0	1,94	0	1,9	0	425
40°C	D	D2	3,01	0	2,09	0	2,09	0	2,05	0	1,99	0	500
4		D3	3,11	0	1,97	0	1,95	0	1,97	0	1,93	0	500
		E1	2,46	17	2,6	13	2,08	22	2,02	17	2,07	16	425
20°C	E	E2	3,01	17	1,97	13	2,03	22	1,96	17	2,01	16	500
		E3	3,12	17	1,99	13	2,06	22	2,02	17	2,98	16	500





	LUNES	MARTES	MIÉRCOLES	JUEVES	VIERNES
Variación de color	•	D1, E	D1, E1, E2	D1, E1, E2	D, E
Homogeneidad		A, B, C, D2, D3, E	A, B, C, D2, D3, E	A, B, C, D2, D3, E	A, B, C1, C3, D, E
Partículas/Precipitación	-	A1	A1	Ninguno	Ninguno
Sedimentación	-	A1	A1	Ninguno	Ninguno
Olor	-	E	E1, E2	D1	C, D, E
Separación de fases	-	D1	D1	D1	C2

**Tabla 4.-** Prueba 2. Estudio Organoléptico.

### Prueba 3

Semana del 21-25/05/2018

**Tabla 5.-** Comparativa de pH e iluminación (en lux) a 22°C y 30°C; a distinto contenido de materia orgánica (MO en g): (1) frasco abierto; (2) frasco cerrado; (3) frasco cerrado y recubierto con aluminio.

			NO (-)	LUN	ES	MAR	TES	MIÉRC	OLES	JUE	VES	VIER	NES
,	LOTE		MO (g)	pН	lux	pН	lux	pН	lux	pН	lux	pН	lux
		A1		2,62	112	2,75	157	2,18	157	2,18	252	2,16	215
	А	A2	25	2,62	112	2,41	157	2,27	157	2,27	252	2,24	215
		А3		2,61	112	2,27	157	2,29	157	2,28	252	2,22	215
		B1		2,25	112	2,43	157	2,41	157	2,4	252	2,34	215
	В	B2	50	2,25	112	2,48	157	2,58	157	2,56	252	2,54	215
22°C		В3		2,25	112	2,7	157	2,42	157	2,43	252	2,38	215
22		C1		2,26	112	2,63	157	2,56	157	2,52	252	2,51	215
	С	C2	75	2,26	112	3,1	157	3,55	157	3,65	252	3,67	215
		СЗ		2,26	112	2,96	157	3,27	157	3,34	252	3,46	215
		D1		2,27	112	4,01	157	4,38	157	4,53	252	4,61	215
	D	D2	100	2,27	112	3,01	157	3,28	157	3,25	252	3,21	215
		D3		2,27	112	2,88	157	2,86	157	2,84	252	3,37	215
		E1		2,27	0	2,35	0	2,3	0	2,27	0	2,27	0
	Е	E2	25	2,27	0	2,25	0	2,23	0	2,21	0	2,2	0
		E3		2,27	0	2,31	0	2,26	0	2,24	0	2,24	0
		F1		2,27	0	2,5	0	2,52	0	2,47	0	2,48	0
	F	F2	50	2,27	0	2,42	0	2,44	0	2,41	0	2,47	0
30°C		F3		2,27	0	2,78	0	2,96	0	2,93	0	2,94	0
30		G1		2,25	0	2,67	0	2,61	0	2,61	0	2,64	0
	G	G2	75	2,25	0	2,65	0	2,74	0	2,76	0	2,79	0
		G3		2,25	0	2,6	0	2,63	0	2,61	0	2,67	0
		H1		2,28	0	2,51	0	2,73	0	2,74	0	2,76	0
	н	H2	100	2,28	0	2,83	0	2,77	0	2,77	0	2,79	0
		НЗ		2,28	0	2,46	0	2,61	0	2,7	0	2,75	0

# **ABS LAB**

**Tabla 6.-** Prueba 3. Evolución del pH respecto a la carga orgánica/tiempo.

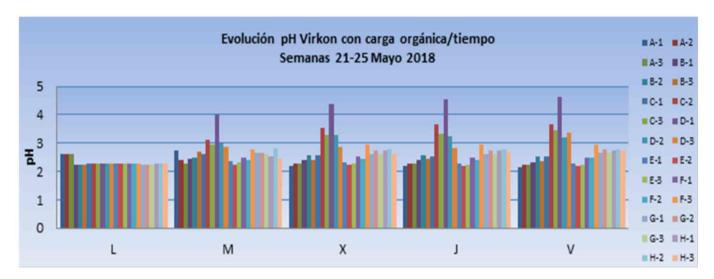


Tabla 7.-Prueba 3. Cultivo de placas TSA (UFC, Unidades Formadoras de Colonia. (1) frasco abierto; (2) frasco cerrado; (3) frasco cerrado y recubierto con aluminio.

	LOTE		MO (g)	UFC
		Al		-
	A	A2	25	7-
		A3		-
		B1		-
	В	B2	50	SI
22°C		В3		-
22°C		C1		-
	C	C2	75	SI
		C3		SI
		D1		SI
	D	D2	100	SI
		D3		SI

	LOTE		MO (g)	UFC
		El		
	E	E2	25	-
		E3		-
		F1		*
	F	F2	50	-
30°C		F3		SI
30 C		G1		SI
	G	G2	75	SI
		G3		SI
		H1		SI
	н	H2	100	SI
		Н3		SI



### Prueba 4

Semana del 9-13/07/2018

**Tabla 8.-** Comparativa de pH e iluminación (en lux) a 22°C y 30°C; M.O. seleccionadas: (1) frasco abierto; (2) frasco cerrado; (3) frasco cerrado y recubierto con aluminio.

	LOTE		MO (a)	LUN	NES	MAR'	TES	MIÉRC	OLES	JUE	/ES	VIER	NES
	LOTE		MO (g)	рН	lux	pН	lux	рН	lux	рН	lux	рН	lux
20		A1	0	2,24	120	2,16	120	2,08	120	2,08	73	2,06	69
22 °C	A	A2	25	2,33	120	2019	120	2,67	120	2,62	73	2,53	69
	7	А3	50	2,83	120	3,66	120	2,69	120	3,65	73	3,6	69
		B1	0	2,22	120	2,12	120	2,06	120	2,05	73	2,01	69
30 °C	В	B2	25	2,46	120	2,66	120	2,56	120	2,5	73	2,39	69
		В3	50	2,66	120	3,57	120	3,55	120	3,53	73	3,48	69

Tabla 9.- Prueba 4. Evolución del pH respecto a la carga orgánica / tiempo.

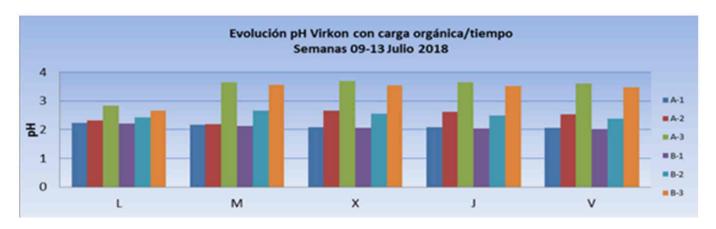


Tabla 10.- Cultivo de placas TSA (UFC, Unidades Formadoras de Colonia). (1) frasco abierto; (2) frasco cerrado; (3) frasco cerrado y recubierto con aluminio.

	LOTE		MO (g)	UFC								
			WC (g)	LUNES	MARTES	MIÉRCOLES	JUEVES	VIERNES	A LOS 7 DÍAS			
200		A1	Sin carga	-	-	-	-	*	-			
22 °C	Α	A2	25	-	SI	-	-	-	-			
• • •		А3	50	SI	SI	SI	SI	-	-			
		B1	Sin carga	-	-	-	-	-	-			
30 °C	В	B2	25	SI	> <b>-</b>	SI	-	-	-			
63		В3	50	SI	-	SI	-	-	-			



### Prueba 5

Semana del 24-28/09/2018

**Tabla 11.-** Comparativa de pH e iluminación (en lux) a 22°C y 30°C (lunes: estancia a oscuras); (en ausencia/presencia de materia orgánica). (1) frasco abierto; (2) frasco cerrado; (3) frasco cerrado y recubierto con aluminio.

	LOTE		110 ( )	LUNES		MARTES		MIÉRCOLES		JUEVES		VIERNES	
			MO (g)	рН	lux	рН	lux	pН	lux	pН	lux	рН	lux
		A1	0	2,09	-	2,05	412	2,05	450	2,03	414	2,05	412
22 °C	A	A2	25	2,27	-	2,4	412	2,4	450	2,33	414	2,33	412
155		А3	50	2,32		3,07	412	3,21	450	3,24	414	3,26	412
1200		B1	0	2,21	-	2,11	381	2,09	391	2,05	367	2,05	367
30 °C	В	B2	25	2,23	-	2,47	381	2,51	391	2,47	367	2,47	367
67		В3	50	2,33	-	2,75	381	2,92	391	2,85	367	2,85	367

**Tabla 12.-** Prueba 5. Evolución del pH respecto a la carga orgánica/tiempo.

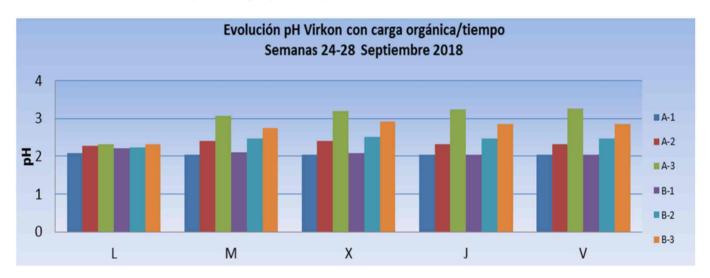


Tabla 13.- Cultivo de placas TSA (UFC, Unidades Formadoras de Colonia). (1) frasco abierto; (2) frasco cerrado; (3) frasco cerrado y recubierto con aluminio.

	LOTE		MO (g)	UFC							
	LOIE		MO (g)	LUNES	MARTES	MIÉRCOLES	JUEVES	VIERNES	A LOS 7 DÍAS		
		A1	Sin carga	-	-	=	¥	-			
22 ºC	Α	A2	25	-	=	H	¥	-			
		А3	50	-	. <del>.</del> .	-	-	SI			
		B1	Sin carga	-	-	-	-	-			
30 €C	В	B2	25	-	-	-	-	SI			
		В3	50	-	-	~	SI	SI			



### **ANIMALES DE LABORATORIO**

OTOÑO 2020 / NÚMERO 87

### Prueba 6

Semana del 15-19/10/2018

Tabla 14.- Comparativa de pH e iluminación (en lux) a 22°C y 30°C; (ausencia de materia orgánica). (1) frasco abierto; (2) frasco cerrado; (3) frasco cerrado y recubierto con aluminio.

	LOTE			LUNES		MARTES		MIÉRCOLES		JUEVES		VIERNES	
'			MO (g)	pН	lux	рН	lux	рН	lux	рН	lux	рН	lux
		A1	0	2	397	2,03	458	1,98	575	1,98	455	2	462
22 ºC	Α	A2	25	2,25	397	2,81	458	2,61	575	2,56	455	2,53	462
		А3	50	2,25	397	3,22	458	3,55	575	3,72	455	3,76	462
-		B1	0	2,09	467	2,1	486	2,04	487	2,03	419	2,06	459
30 €C	В	B2	25	2,26	467	2,79	486	2,73	487	2,71	419	2,66	459
- 37		В3	50	2,42	467	3,82	486	4,03	487	4,18	419	4,22	459

Tabla 15.- Cultivo de placas TSA (UFC, Unidades Formadoras de Colonia): (1) frasco abierto; (2) frasco cerrado; (3) frasco cerrado y recubierto con aluminio.

18	LOTE		MO (-)	UFC								
			MO (g)	LUNES	MARTES	MIÉRCOLES	JUEVES	VIERNES	A LOS 7 DÍAS			
	A	A1	Sin carga	-	-	-	-	-	-			
22 ºC		A2	25	-	-	-	-	-	-			
		А3	50	-	-	-	-	-	-			
		B1	Sin carga	-	-	-	-	-	-			
30 º€	В	B2	25	-	-	-	-	-	-			
		В3	50	-	-	SI	SI	SI	SI			

### CONCLUSIONES

- 1. RELY+ON™ VIRKON™ se descompone a temperaturas ≥40°C, perdiendo su estabilidad.
- 2. A 4°C, aunque se observa turbidez, sigue manteniéndose el pH estable, por lo que RELY+ON™ VIRKON™ mantiene su actividad.
- 3. A temperatura >30°C, RELY+ON™ VIRKON™ sufre pérdida de color o aparición de olor clorado (producto de su descomposición en cloro e hipoclorito) y óxidos/dióxidos de azufre.
- 4. La ausencia o presencia de luz natural o artificial no afecta a la estabilidad de RELY+ON™VIRKON™.
- 5. En ausencia de materia orgánica, RELY+ON™VIRKON™ el pH se mantiene estable a cualquier temperatura.
- En presencia de materia orgánica y en cantidades superiores a 25 g/l, el pH aumenta y RELY+ON™ VIRKON™ pierde su acción descontaminante.

### **AGRADECIMIENTOS**

A la empresa FHP S.L. por su colaboración y asesoramiento técnico.

### BIBLIOGRAFÍA

- Biocidas. Ministerio para la transición ecológica. 2020.www.miteco. gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/productosquimicos/biocidas/
- Broadley J., Furr J.R., Jenkins P.A., et al. Antimycobacterial activity of "Virkon S". The Journal of Hospital Infection. 1993;23(3):189-97.
- Guía para la realización y presentación de estudios de estabilidad.
   2018. Instituto de Salud pública, Ministerio de Salud, Chile.
   www.ispch.cl/sites/default/files/GUIA%20DE%20ESTABILIDAD
- 4. Ficha de datos de seguridad. Dupont. www.dupont.hk
- 5. Hospital Disinfection Experts. Biosteril. www.biosterit.it/en/virkon
- Organoléptico. https://boletinagrario.com/ap-6,organoleptico, 963.html



## Cómo hacer visible lo invisible: sistema de tarjetas

Gema Luque y Esmeralda Muñoz

Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)

Palabras clave: tarjetas de identificación, roedores, cubetas.

### INDICIO

Un sistema de tarjetas nos permite visualizar de forma clara y concisa todo lo que se está llevando a cabo en los animales incluidos en una cubeta.

### PLANTEAMIENTO

Según el Real Decreto 53/2013 todas las cubetas de alojamiento de roedores deben estar provistas de un sistema de identificación que incluya la especie, raza, cepa, sexo, fecha de nacimiento, fecha de cruce (si son parejas), número de animales y el código de proyecto aprobado por la Autoridad Competente, permitiéndonos con ello identificar de forma precisa tanto al responsable, como los procedimientos autorizados.

La normativa actual junto con la necesidad de tener información clara y rápida de todo lo que está ocurriendo dentro de dicha cubeta ha hecho que a lo largo de los años todo el personal del animalario haya participado en la implementación de un sistema de tarjetas identificativas (ver Figura 1). Esta herramienta visual nos permite llevar un control muy eficaz de los animales, evitando errores e incluso mejorando su bienestar.



Figura 1.- Diversas tarjetas identificativas que utilizamos.

Este sistema nos permite mostrar gran cantidad de información, como se presenta a continuación:

- Stock: tarjeta que puede presentarse en diferentes colores (para diferenciar al usuario responsable de los animales contenidos en la cubeta) y contiene, como mínimo, los datos obligatorios incluidos en el RD 53/2013.
- Permanent breed y Single breed: tarjeta que puede presentarse en diferentes colores (para diferenciar al usuario responsable del cruce) y que identifica un cruce activo simple (single breed, una única camada) o permanente (permanent breed, cruce que se mantiene, normalmente, hasta el decaimiento en el número de camadas o crías).
- Sentinels: identifica a los animales seleccionados como centinelas para ser utilizados en los controles sanitarios periódicos realizados según las recomendaciones de FELASA.
- Procedure: identifica el procedimiento que están sufriendo o han sufrido todos o algunos de los animales incluidos en la cubeta. Además, podemos encontrar tarjetas de procedimientos específicos como son las de Surgical para cirugías (se deberá cumplimentar no sólo el tipo de cirugía, sino también la fecha de realización, el tipo de anestesia utilizado y la aplicación diaria de analgesia) o la de Fasting para ayunos, (se deberá indicar la fecha con la hora de comienzo y finalización del procedimiento).
- Drink treatment y Feed treatment: indica que el animal o animales incluidos en la cubeta están bajo un tratamiento específico de bebida o comida. En el caso de ser un tratamiento en bebida, además, se administrará en un biberón negro (independientemente de su fotosensibilidad) y los pellets de tratamiento deben ser diferentes en forma y color a los del pienso de mantenimiento.



OTOÑO 2020 / NÚMERO 87

- Pato-identificador: nos indica si existe uno o más animales dentro de la cubeta con una observación clínica activa (también se incluye en la aplicación informática del animalario). La severidad de esta se reconoce por el color de la tarjeta: leve-verde, moderado-amarillo y severo-rojo. Aquellos animales que presenten una tarjeta roja serán revisados ese mismo día por el técnico o veterinario que tomará la decisión más adecuada con respecto a su estado (ver Figura 2).



**Figura 2.-** Ejemplo de una cubeta con diferentes tarjetas identificativas: stock, cuarentena, malocclusión, en un procedimiento quirúrgico, feed treatment y con un pato-identificador, en este caso color rojo.

- Malocclusion: esta tarjeta es una variante del patoidentificador que nos indica que uno o varios animales de la cubeta presentan este tipo de incidencia y donde se anotará su revisión periódica. Aunque los animales con este tipo de patología no se suelen mantener, tenemos casos excepcionales en los que se deben conservar (fenotipo de la línea) y esta tarjeta nos ayuda a llevar un control más exhaustivo del proceso.
- Cuarentena: esta tarjeta se coloca cuando llegan animales externos y se mantiene durante toda la fase de aclimatación. Identificamos así que esos animales deben manipularse de

forma especial. También se puede utilizar en cualquier otro momento que sea necesario hacer un manejo excepcional de la cubeta.

- Negative y Positive plug: identifica la existencia o no de tapón vaginal en hembras previamente cruzadas en las que se solicita la confirmación de monta.
- Pre-wean y Wean: ayuda al técnico a identificar rápidamente en qué momento se encuentra la camada o camadas existentes en una cubeta y así agilizar su trabajo diario.
- **Cage movement:** identifica un cambio de localización de la cubeta dentro de las instalaciones del animalario.
- Weekend: identifica que la cubeta tiene un procedimiento especial a llevar a cabo durante el fin de semana o día festivo.
- Shipment: identifica que los animales contenidos en la cubeta se encuentran en una exportación en curso.
- Dietas especiales: esta tarjeta no se presenta en las cubetas que contienen animales, sino en otras cubetas habilitadas para contener piensos especiales. Con ella, se lleva un control de la fecha de apertura y caducidad de estos.

### **COMENTARIOS Y CONCLUSIONES**

Durante el paso de los años y con la implementación de las diferentes tarjetas mostradas hemos notado un aumento considerable en la eficiencia del trabajo, haciendo más visible cualquier notificación y disminuyendo el número de errores en la manipulación de las cubetas.

# 



# Un poco de su sangre supone mucho avance en las técnicas diagnósticas de la encefalitis vírica del Nilo Occidental

El virus del Nilo Occidental (VNO) es un flavivirus transmitido por mosquitos que induce encefalitis letal en humanos y caballos. Se trata de un patógeno zoonótico emergente cuya propagación geográfica e incidencia en humanos, caballos y aves ha aumentado significativamente en los últimos años. Durante mucho tiempo se ha considerado un patógeno leve, que causa brotes autolimitados. Esta noción ha cambiado ya que el VNO está causando grandes epidemias con un alto impacto en la salud humana y animal.

A menudo, en humanos su clínica se confunde con la de otras encefalitis, y es por ello por lo que se requieren pruebas diagnósticas más sensibles y específicas. El suero, y las células del bazo y del cerebro de este animal están contribuyendo a la elaboración de mejores pruebas diagnósticas basadas en la PCR y los anticuerpos monoclonales.





Powering your research development



# Profesionales al servicio de la investigación

### Servicios integrales para Animalarios

Externalización de servicios de Animalarios
...
Formación de personal
...
Diseño de Instalaciones
...
Alquiler y gestión de Instalaciones
...
Consultoría y Asesoramiento



www.vivotecnia-ms.com



# The Weight is Over.

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

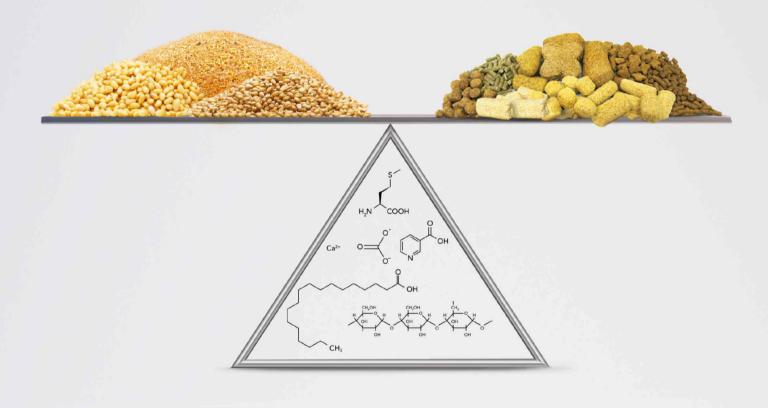
For more information, please contact us at services@eu.crl.com





# Teklad Global Diets®

Ingredient selection is key to reducing rather than introducing variation



Envigo Teklad's fixed formula diets contain the same ingredients, in the exact same quantities, in every batch of diet. This translates to more consistent, reliable and meaningful research results.

Request a consultation with our experienced nutritionists askanutritionist@envigo.com

+