



# ANIMALES DE LABORATORIO

## INVESTIGACIÓN ONCOLÓGICA

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

### 1 NOTICIAS DE SECAL

- RESUMEN DE LA REUNIÓN DE LA JUNTA DE GOBIERNO DE 26 DE MARZO
- JORNADAS ICLAS ESPAÑA

### 2 ARTÍCULOS

- RATONES Y CÁNCER: TODA UNA VIDA JUNTOS
- APLICACIÓN DE MODELOS MURINOS PARA EL ESTUDIO DE TERAPIAS ANTI-ANGIOGÉNICAS

### 3 TÉCNICAS

- TÉCNICAS QUIRÚRGICAS EN UN MODELO DE CÁNCER DE COLON EN LA RATA

### 4 PRESIÓN POSITIVA

- ACREDITACIÓN AAALAC INTERNACIONAL: SÍMBOLO DE CALIDAD
- IMPORTANCIA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL EN LA REDUCCIÓN DEL USO DEL ANIMAL DE LABORATORIO

### 5 ¿Y TÚ QUÉ OPINAS?

- ALOPECIA FACIAL EN RATONES
- MODELO DE XENOINJERTO TUMORAL

### 6 PÁGINAS WEB

- GENÓMICA Y MODELOS MURINOS

### 7 SEGURIDAD EN 5 MINUTOS

- CAÍDAS AL MISMO NIVEL

### 8 ENTREVISTAS

- LUIS MUÑOZ DE LA PASCUA
- JORDI POLO MARÍN



GRUPO EDITOR

DIRECTORA

Joana Visa  
jvisa@idibell.org

SUBDIRECTORA

Dolores García Olmo

RESPONSABLES SECCIONES

Jose Luis Martín Barrasa  
Jesús Martínez Palacio  
M<sup>a</sup> Granada Picazo Martínez  
Isabel Clara Rollán Delgado  
Hernán Serna Duque

CORRECCIÓN DE ESTILO

Joana Esteve  
Dolores García Olmo

PUBLICIDAD

Jesús Martínez Palacio

DISTRIBUCIÓN DE REVISTA

Carmina F. Criado

DISEÑA - IMPRIME

Enrique Nieto  
& Asociados, S. A.  
Tel.: 902 200 292  
w@enyas.com

DEPÓSITO LEGAL

M-1362-1999

INVESTIGACIÓN ONCOLÓGICA CON ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

La OMS (Organización Mundial de la Salud) ha estimado que las causas más frecuentes de muerte de adultos en países desarrollados son las enfermedades neurodegenerativas (asociadas en gran medida al incremento de la esperanza de vida), las patologías cardiovasculares (directamente relacionada con el tipo de vida de los países desarrollados) y el cáncer (con un gran componente genético).

Según datos obtenidos del Ministerio de Sanidad, cada año se diagnostican unos 180.000 nuevos casos de cáncer, situando esta patología como la primera causa de muerte desde el año 1999. Cabe destacar que, si separamos los datos por género, en el hombre la primera causa de muerte es el cáncer de pulmón, mientras que en la mujer, son las enfermedades cardiovasculares las que se sitúan en primer lugar, siendo la de mama la patología cancerosa más frecuente.

Este Ministerio inició en 2005 la “Estrategia contra el cáncer del Sistema Nacional de Salud”, cuyos objetivos son la mejora del diagnóstico precoz y el estudio de tratamientos eficaces, que, generalmente, se deben testar en animales de laboratorio. Este año, el Instituto de Salud Carlos III -una de las fuentes más importantes de financiación pública para investigación-, ha seguido dando prioridad a la investigación oncológica, como línea a potenciar y financiar

En Europa, el uso de animales (roedores) como modelos de enfermedades humanas, se ha incrementado un 60% entre los años 2002 y 2005. En España, más del 15% del total de ratones utilizados está directamente relacionado con patologías tumorales: ratones genéticamente modificados que desarrollan cáncer en pocas semanas, xenotransplantes de tumores humanos a ratones inmunodeprimidos, desarrollo de tumores a partir de líneas celulares animales o humanas, etc. En el presente número se presenta una técnica quirúrgica relacionada con un modelo de cáncer colorrectal en la rata, y el uso de modelos genéticamente modificados para el estudio del desarrollo vascular relacionado con el cáncer de páncreas (insulinomas). Asimismo, en la sección “¿Y tú que opinas?” se nos describe un modelo de xenoinjerto tumoral

En la mayoría de modelos de cáncer, es de especial importancia disponer de un adecuado protocolo de supervisión del bienestar animal. Para que el investigador cumpla con este tipo de protocolos, es necesario que sus indicadores estén cuantificados según su severidad (por ejemplo de 1 a 3, siendo 3 grave), que sean lo más objetivos posibles (tamaño de tumores, pérdida de peso), fáciles de medir (sin olvidar aspectos metodológicos importantes, como por ejemplo, el hecho de que el control de la temperatura sin telemetría no es útil), y en algunos casos es necesario ir adaptando el protocolo conforme se desarrolla el procedimiento experimental.

Si el objetivo es cumplir los principios de las “Tres Erres” (reducción, reemplazo y refinamiento), es imprescindible que el protocolo de supervisión contenga los criterios de punto final (indicadores a partir de los cuales se debe sacrificar el animal, aunque no se haya alcanzado algunos de los objetivos del procedimiento), y que el investigador los entienda y los acepte. Organizaciones como el AAALAC (podemos revisar su misión en la sección de “Presión Positiva”), nos pueden ayudar a definir los criterios a cumplir y dar fuerza al personal del animalario frente a aquellos usuarios menos sensibles a aspectos relacionados con el bienestar animal

Para finalizar, el hecho de que España tenga una tasa de mortalidad por cáncer muy parecida a la europea y no superior, quizá esté de algún modo relacionado con el buen uso del animal de laboratorio para este tipo de procedimientos, que repercute en la calidad de la investigación oncológica que se desarrolla en nuestro país. Al personal relacionado con el uso de animales como modelos de cáncer, “sólo” nos queda seguir trabajando para dar a conocer los principios definidos en las “Tres Erres”, y seguir incrementando la calidad de este tipo de investigación.





# Noticias de la SECAL

## RESUMEN DE LA REUNIÓN DE LA JUNTA DE GOBIERNO DE LA SECAL

26 DE MARZO DE 2009

La Junta de Gobierno de la SECAL celebró una nueva reunión ordinaria el pasado 26 de marzo en Barcelona. En ella, se trataron los siguientes asuntos:

- **Nueva normativa en preparación:** la Presidenta de la SECAL fue convocada por la Secretaría de Estado de Investigación (Ministerio de Ciencia e Innovación), para mantener una reunión sobre el proceso de la acreditación de categorías para el uso de animales de experimentación. En ella, se informó de que se está elaborando un texto, que se publicará con rango de Real Decreto, con el que se pretende regular la obtención de estas categorías. El fin de esta reunión, por parte de los representantes de la Administración, fue obtener más información de la situación actual y particularidades de los profesionales de este ámbito.
- **Comentarios a la propuesta de nueva Directiva sobre protección de animales utilizados con fines científicos:** tras la publicación de esta propuesta, el 5 de noviembre de 2008, diversas entidades y sociedades, entre las que se incluyen SECAL y FELASA, han elaborado sus respectivos documentos con comentarios y correcciones a este texto. Recientemente, la SECAL manifestó asimismo su conformidad al documento de enmiendas elaborado por la Comisión de Agricultura y Desarrollo Rural del Parlamento Europeo (AGRI), con fecha 5 de febrero de 2009.
- **Discusión de documentos y propuestas de FELASA:** se valoraron y aprobaron distintas

actuaciones de FELASA. Concretamente, se aprobó la versión final del documento sobre formación para Categoría A (“Education of FELASA Category A: Persons, taking care of animals”), y la composición de otros nuevos grupos de trabajo: “Glossary of Clinical Signs” y “Education of Students”. Asimismo, el documento titulado “Guidelines for continuing education for persons involved in animal experiments – Recommendations of a FELASA Working Group”, fue valorado positivamente por la Junta. Este documento lleva consigo la implicación de la SECAL -como del resto de miembros de FELASA-, en distintas gestiones relacionadas con la formación continuada, tales como la acreditación de cursos.

- **Actividades formativas:** se ultimó la puesta en marcha de distintas actividades formativas, de las que posteriormente se informó a los socios por los cauces habituales. Entre ellas, las jornadas técnicas en colaboración con casas comerciales, el “Curso de Prevención de Riesgos Laborales” del CIEMAT, y el curso de “Análisis Genético”, promovido por el mismo Centro.
- **X Congreso de la SECAL, Salamanca 2009:** la Junta valoró muy positivamente la evolución de la organización de este evento. El plazo de inscripción y envío de comunicaciones continúa abierto. Todas las novedades se pueden consultar en la página web propia del Congreso:  
<http://fundacion.usal.es/secal2009>.

# OTRAS NOTICIAS

## JORNADA ICLAS ESPAÑA

*Olga María Fernández*

*Unidad Cirugía Experimental*

*Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia*

En los albores de la Medicina Moderna -segunda mitad del s. XIX-, el número de animales de experimentación empleado era tan pequeño que no había producción organizada. A partir de la tercera década del siglo XX, y como consecuencia de la creciente demanda, se fue haciendo patente la necesidad de producir y emplear animales sanos, libres de enfermedades que pudieran interferir en los procedimientos experimentales. Además y paralelamente, cobraron importancia factores como la calidad de los piensos y el control de las condiciones medioambientales.

De esta manera, a principios de los años 50 tuvieron lugar las primeras reuniones entre instituciones nacionales y organizaciones internacionales, con el fin de difundir y discutir estos requerimientos de calidad, tanto en el uso de animales en investigación, como en su producción. Es entonces cuando, a partir de estas iniciativas, se establecieron el "International Committee on Laboratory Animals" (ICLA), que más tarde llegaría a ser el "International Council for Laboratory Animal Science" (ICLAS). Desde sus orígenes, el ICLAS apoya la unificación o armonización de directrices, legislaciones y otras formas de regulación del cuidado y empleo del animal de laboratorio.

El pasado 11 de marzo se celebró en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), la primera Jornada Científica del Comité Español ICLAS. Los objetivos de la Jornada, enfocada principalmente a los investigadores, fueron, fundamentalmente, difundir aspectos prácticos del diseño de experimentos con modelos modificados genéticamente, y analizar los procesos de revisión ética de los proyectos con animales.

Tras la presentación de la Jornada -a cargo de Javier Guillén, de AAALAC International-, la Dra. Susan Bello, de "The Jackson Laboratory", expuso la ponencia titulada: "Finding your Mouse: Navigating mouse resources using MGI". La Dra. Bello es una de las encargadas científicas de la actualización y expansión del recurso denominado "Mouse Genome Informatics" (MGI) y, a lo largo de su ponencia, nos demostró por qué MGI es una valiosísima base de datos de genética y genómica murina. Así, la comunidad científica puede emplear esta base para encontrar modelos murinos de enfermedades humanas, cepas portadoras de una mutación específica en un gen dado, nomenclatura aprobada para un gen o un alelo, caracterización y función de genes murinos, links a otras bases de datos.

En segundo lugar, el Dr. David P. Wolfer, del "Institute of Anatomy" de la Universidad de Zurich, presentó la ponencia que llevaba por título: "Phenotyping of genetically modified mice: important considerations regarding genetic background", en la que, sobre la base de su amplia experiencia, nos convenció de la importancia del fondo genético como modulador del fenotipo en ratones modificados genéticamente, y nos proporcionó valiosas recomendaciones en el mantenimiento de líneas transgénicas.

A continuación el Dr. Brendon P. Scicluna, del "Heart Failure Research Center" de la Universidad de Amsterdam, con su ponencia titulada: "Genetic background plays an important role in modulating the cardiac conduction phenotype in a murine channelopathy", nos mostró un caso de diferencias fenotípicas entre ratones de distinto fondo genético y portadores de la misma mutación. Así, el Dr. Scicluna expuso que, tras desarrollar un modelo mu-

tante de canalopatía cardiaca de ión sodio, en fondo genético 129P2, y al transferir la mutación al fondo genético FVB/N, observó cómo los déficits en la conducción eran más severos en la cepa original.

Después de disfrutar del vino español ofrecido por el Centro, el Dr. Maurizio Salvi, miembro de la Oficina de Consejeros de Política Europea (BEPA) y director del Grupo Europeo de Ética en Ciencia y Nuevas Tecnologías (EGE), presentó la ponencia titulada “The ethical review of research projects under the 7th Framework Programme: requirements, procedures, methods”. El Dr. Salvi resaltó que el bienestar animal, la investigación en las 3Rs (reducir, refinar y reemplazar), y el apoyo a los métodos alternativos a la experimentación animal, son temas prioritarios en el Séptimo Programa Marco de Investigación y Desarrollo Tecnológico de la Unión Europea para el periodo 2007-2013.

Posteriormente, Dña. Pilar León, de la Subdirección General de Sanidad Animal del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, presentó la ponencia “Evaluación de los procedimientos en la Administración General del Estado. Perspectivas de control ético en la propuesta de nueva Directiva Europea”, en la que recordó los procesos de revisión ética de los proyectos con animales de investigación recogidos en el Real Decreto 1201/2005. Además, revisó los nuevos aspectos referentes a la evaluación ética de los proyectos con animales de investigación, que aparecen en la nueva propuesta de Directiva Europea relativa a la protección de animales utilizados para fines científicos.

Finalmente, la Dra. Carmen Piñol, de la Universidad de Lérida, expuso la ponencia que llevaba por título “Experiencia y futuro de la Comisión de Experimentación Animal en Cataluña”, en la que expuso su experiencia a lo largo de los 10 años que lleva en activo la Comisión Ética Catalana, y compartió con nosotros valiosas recomendaciones para poner en práctica en los comités éticos de experimentación animal de nuestros centros.



# 2 ARTÍCULOS

## RATONES Y CÁNCER: TODA UNA VIDA JUNTOS

---

**Luis Muñoz de la Pascua**  
**Manuel Sánchez Martín**

*Servicio de Experimentación Animal (SEA)*  
*Universidad de Salamanca*

Cumplimos 100 años... Mejor dicho, nuestro protagonista cumple 100 años de estancia en nuestros laboratorios. ¡Quien se lo iba a decir a William Ernest Castle y a su brillante estudiante, Clarence Little, cuando comenzaron en Harvard a principios del siglo XX los primeros estudios genéticos utilizando como modelo a nuestro ilustre protagonista! Han pasado ya 100 años de aquello y hoy, más que entonces, el ratón es el mejor modelo y el más utilizado, especialmente en biomedicina. Durante estos 100 años de andadura, los estudios utilizando ratones de laboratorio han reportado varios premios nobeles y han contribuido (y continúan haciéndolo) de manera destacada al desarrollo de la inmunología, la genética y las ciencias de la salud. De hecho, hoy se utilizan más de 25 millones de ratones al año para distintos proyectos relacionados con la salud humana y la biología, y es seguro que este número continuará incrementándose.

### DOS HITOS MARCARON NUESTRO CAMINO

Durante estos últimos 100 años, hemos de destacar dos hitos de especial relevancia relacionados con el ratón y el desarrollo de las ciencias de la vida; son la generación de cepas genéticamente homogéneas, o líneas consanguíneas (también conocidas por el término inglés como cepas “inbred”), y el desarrollo de las técnicas para manipular a nuestro antojo el genoma del ratón.

Empezando por el primero de los hitos mencionado, también conocido como “estandarización genética”, es de tal relevancia el poder contar con estas cepas consanguíneas, que más del 90% de las publicaciones científicas en estos campos utilizan este tipo de líneas. Fue precisamente Clarence Little, el científico que comenzara con la generación de estas líneas consanguíneas en 1909, generando por sucesivos retrocruzamientos la primera cepa de ratones consanguíneos llamada “DBA”. Estas líneas son de vital importancia a la hora de reproducir nuestros experimentos en otros lugares del mundo, ya que cada individuo de la colonia es genéticamente idéntico en un porcentaje cercano o superior al 99%, con la mayoría de sus loci en estado homocigótico. El uso de estas cepas en investigación evita la variabilidad genética y nos asegura la reproducibilidad de nuestros resultados. Además, cada cepa posee unas características fenotípicas únicas que las hacen diferentes de las demás, tales como la sensibilidad o resistencia a desarrollar ciertas enfermedades. Por ejemplo, la cepa FVB es ampliamente utilizada por la comunidad científica en los estudios de cáncer de mama, por su sensibilidad al desarrollo de este tipo de tumores, mientras que la cepa C57Bl/6 es más resistente. En muchas ocasiones, esta sensibilidad o resistencia al desarrollo de ciertos tumores se pone de manifiesto cuando exponemos a estas líneas a distintos agentes como carcinógenos, virus o radiaciones. Estos modelos han sido y son muy útiles para la identificación de oncogenos

y genes supresores de tumores, así como para la identificación de genes de susceptibilidad o genes modificadores.

Como contrapartida, hemos de mencionar que estos modelos también tienen sus limitaciones, especialmente cuando comparamos los tumores que desarrollan con los humanos; y es que en muchas ocasiones, estos modelos desarrollan un subtipo muy específico de tumor, con baja penetrancia y un grado de latencia variable. Sin embargo, la observación de estas limitaciones en este tipo de modelos, han contribuido sin duda al desarrollo de una nueva tecnología que permite modificar el genoma de estas cepas de una manera racional y dirigida, y es ésta a la que hacemos referencia como el segundo de los hitos cruciales en el desarrollo de las investigaciones biomédicas: la modificación genética del genoma del ratón a nuestro antojo.

Este segundo hito tiene lugar gracias al avance tecnológico que acompañó al descubrimiento del DNA. Desde que fue revelada la estructura del DNA por Watson y Crick, en los años 50, comenzó una sucesión imparable de descubrimientos que aún continúa en nuestros días. En los años posteriores a tan relevante descubrimiento, se describieron procesos fundamentales como la replicación del DNA, la transcripción, y la traducción o síntesis de proteínas. Asimismo, se descifró el código genético y se fue profundizando más y más en lo que se ha deno-

minado “tecnología del DNA recombinante”, o ingeniería genética. Se refiere ésta a la reunión artificial de moléculas de DNA, o de partes de éstas, que no se encuentran juntas en la naturaleza. La tecnología del DNA recombinante comenzó con las enzimas de restricción, capaces de cortar el DNA en secuencias específicas, para poder unir después distintas moléculas de DNA entre sí mediante las denominadas DNA ligasas. Comenzaron a desarrollarse los denominados vectores de clonación como los plásmidos, cromosomas artificiales de bacterias (BACs) y levaduras (YACs), que permiten contener dentro de sí otras moléculas de DNA de diferentes organismos y tamaños, conocidas como insertos. Rápidamente, y gracias al avance de esta tecnología del DNA recombinante, logramos modificar racionalmente el genoma de organismos superiores, especialmente el de nuestro protagonista, el ratón.

## LOS RATONES MODIFICADOS GENÉTICAMENTE Y EL ESTUDIO DEL CÁNCER HUMANO

La generación de este tipo de ratones modificados genéticamente (RMG) nace en los años 80 y nos ha permitido estudiar cuál es la función de un gen o proteína en condiciones fisiológicas y patológicas. La creación de estos RMG es compleja, y resulta de una combinación de la tecnología de DNA recombinante, de cultivos celulares y de la manipulación de

Órgano	Histopatología	Eventos genéticos
Pulmón	Adenocarcinoma	<i>Kras</i> (Ref. 1)
	Carcinoma de células pequeñas	<i>Rb1; Trp53</i> (Ref. 2)
Colon	Adenocarcinoma polipoide	<i>Kras; Apc</i> (Ref. 3)
	Carcinoma hereditario no polipoide	<i>Msh6</i> (Ref. 4)
Mama	Carcinoma Ductal	<i>Brca2; Trp53</i> (Ref. 5)
	Carcinoma Lobular	<i>Cdh1; Trp53</i> (Ref. 6)
Páncreas	Adenocarcinoma Ductal	<i>Kras; Cdkn2a</i> (Ref. 7) <i>Kras; Trp53</i> (Ref. 8)
	Neoplasia cística mucinosa	<i>Kras; Dpc4</i> (Ref. 9)
Próstata	Carcinoma de próstata	<i>Pten</i> (Ref. 10) <i>Pten; Nkx. 1</i> (Ref. 11), <i>Rb1; Trp53</i> (Ref. 12)
Hígado	Carcinoma hepatocelular	<i>Apc</i> (Ref. 13), <i>Myc; Trp53</i> (Ref. 14), <i>Myc; TGFA</i> (Ref. 15)
Ovario	Carcinoma de endometrio	<i>Kras; Pten</i> (Ref. 16), <i>Apc; Pten</i> (Ref. 17)
Esófago	Carcinoma de células escamosas	<i>Pten; Dpc4</i> (Ref. 18); <i>Ccnd1; Trp53</i> (Ref. 19)
Vejiga	Carcinoma de células transicionales	<i>Hras</i> (Ref. 20)
Riñón	Carcinoma renal	<i>Apc; Trp53</i> (Ref. 21)
Cerebro	Astrocitoma	<i>Pten; Rb1</i> (Ref. 22)
	Glioblastoma	<i>Nf1; Trp53</i> (Ref. 23)
Estómago	Carcinoma gástrico	<i>Wnt; Ptgs2; Ptges</i> (Ref. 24)
Piel	Melanoma	<i>HRAS; Ink4a</i> (Ref. 25)
	Carcinoma de células escamosas	<i>Xpd</i> (Ref. 26)
Sangre	Leucemia mieloide crónica	<i>BCR/ABL</i> (Ref. 27)

Tabla 1  
Algunos ejemplos de modelos de RMG que recapitulan tumores humanos.

embriones de ratón. El desarrollo de metodologías celulares y moleculares que permiten la modificación in vivo de la expresión o función de un fragmento de DNA en particular, nos ha hecho poseedores de una de las herramientas más poderosas para examinar la relevancia fisiopatológica de cualquier proteína. Los modelos de RMG son particularmente útiles para estudiar, tanto el desarrollo normal como los problemas biológicos complejos como el cáncer, la gran lacra de las sociedades desarrolladas. En la actualidad, estos modelos de RMG son los más sofisticados para el estudio del cáncer humano y los que mejor recuerdan o mimetizan nuestra enfermedad (Tabla 1).

De manera simple, y haciendo referencia a una cuestión meramente semántica, podemos clasificar a los RMG en ratones transgénicos o endógenos. Ratones transgénicos son los que expresan, a niveles no endógenos o fisiológicos, un determinado transgén. Generalmente, en los modelos de cáncer humano, sobre-expresamos un oncogén o un dominante negativo de un gen supresor de tumores. La expresión de este transgén está dirigida por un promotor ectópico, que puede ser específico o no de un determinado tipo tisular; o también puede estar regulada su actividad por la adición de determinados compuestos químicos tales, como doxiciclina o interferón, haciendo reversible el “encendido” o

“apagado” de la expresión del transgén. Por otro lado, también es posible que el promotor regule la expresión de una oncoproteína de fusión, cuya actividad la podemos regular con la adición de tamoxifeno. En este caso, cuando la proteína es traducida, permanece en conformación inactiva debido a que el dominio de unión del receptor de estrógenos (RE) impide su correcta actividad. La adición de tamoxifeno, que se unirá al RE y producirá un cambio conformacional, permitirá la correcta traslocación al núcleo y actividad de la proteína. En este caso se ha conseguido este sistema con el oncogén MYC (Fig. 1).

En general, los ratones transgénicos se crean por microinyección del DNA desnudo en embriones en fase de una célula. La principal desventaja de estos modelos transgénicos es que resulta imposible una expresión del transgén a niveles endógenos, ya que aunque utilizamos promotores endógenos en la construcción de DNA inyectada, ésta no contiene todos los posibles elementos reguladores de la expresión, que podrían residir en regiones no codificantes, como sucede, por ejemplo, con la regulación que ejercen los microRNAs. Por otro lado, resulta imposible controlar el número de copias que se integrarán en el genoma del ratón, ya que el DNA inyectado se integra en forma de concatémeros. Además, hemos de resaltar que la integración

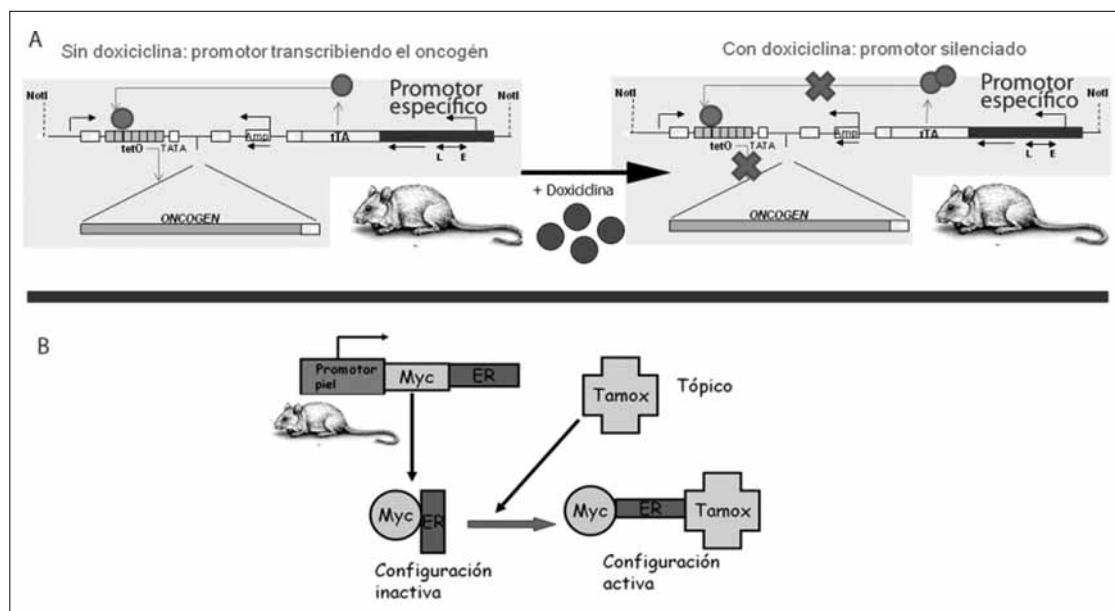


Figura 1. Ejemplos de algunos modelos condicionales de ratones transgénicos. A: Representación esquemática de un modelo transgénico de ratón regulable por la adición de doxiciclina al agua de bebida. B: Representación esquemática de un modelo transgénico de ratón regulable por la acción tóxica del tamoxifeno.

en el genoma se producirá al azar, y que los elementos del genoma que rodearán al transgen podrán influir en su expresión, resultando en una variegación e incompleta penetrancia que podría confundirnos en la interpretación de nuestros resultados. Esto nos obliga a generar varias líneas con la misma construcción de DNA, para corroborar que el fenotipo observado es provocado por el elemento insertado en el genoma del ratón, y no por estos posibles efectos colaterales.

En el estudio de cáncer, estos modelos han sido tremendamente útiles y muy informativos, especialmente los que recapitulan aquellos tumores humanos en los que se sobre-expresa un determinado oncogén, como consecuencia de una traslocación cromosómica. Con estos modelos hemos conseguido demostrar los conceptos de adición oncogénica, y cómo determinados oncogenes juegan un papel clave en el mantenimiento del tumor. Estos modelos han aportado una gran información acerca de la biología del tumor, y nos han servido de base para la generación de nuevos RMG aún más sofisticados.

La segunda clase de RMG a los que hacíamos alusión previamente son los denominados endógenos, y son generados por la manipulación previa de células embrionarias de ratón mediante recombinación homóloga (RH), las cuales se introducirán en

un blastocisto normal. A diferencia de los transgénicos, éstos están modificados de manera sitio-específica; por tanto, la regulación de la expresión del oncogén o la mutación introducida en el genoma, será siempre a niveles fisiológicos. Mediante las mutaciones introducidas sitio-específicamente en el genoma, hemos podido inactivar genes supresores de tumores (conocidos con el término inglés como genes “knock-out”).

Con los primeros ratones así generados hemos podido estudiar los procesos de pérdida de heterocigosidad (LOH), o haploinsuficiencia, que guían la génesis de muchos tumores humanos. Sin embargo, estos modelos no han sido del todo óptimos para estudiar el cáncer humano, ya que éste no es mayoritariamente hereditario (cáncer familiar). Es decir, estas mutaciones surgen de manera espontánea durante la edad adulta y en un determinado tejido, mientras que en el hereditario (igual que sucede en estos modelos), la mutación viene determinada a nivel germinal. Esto nos lleva a que la pérdida de función del gen supresor de tumores, o la mutación activante del oncogén, suceda en todos los tejidos del individuo, generando una serie de alteraciones, efectos de compensación, e incluso letalidad embrionaria, que desvirtúan y podrían invalidar el modelo de estudio.

Para nuestra alegría, hemos conseguido desarrollar estrategias que corrigen esta desventaja y que

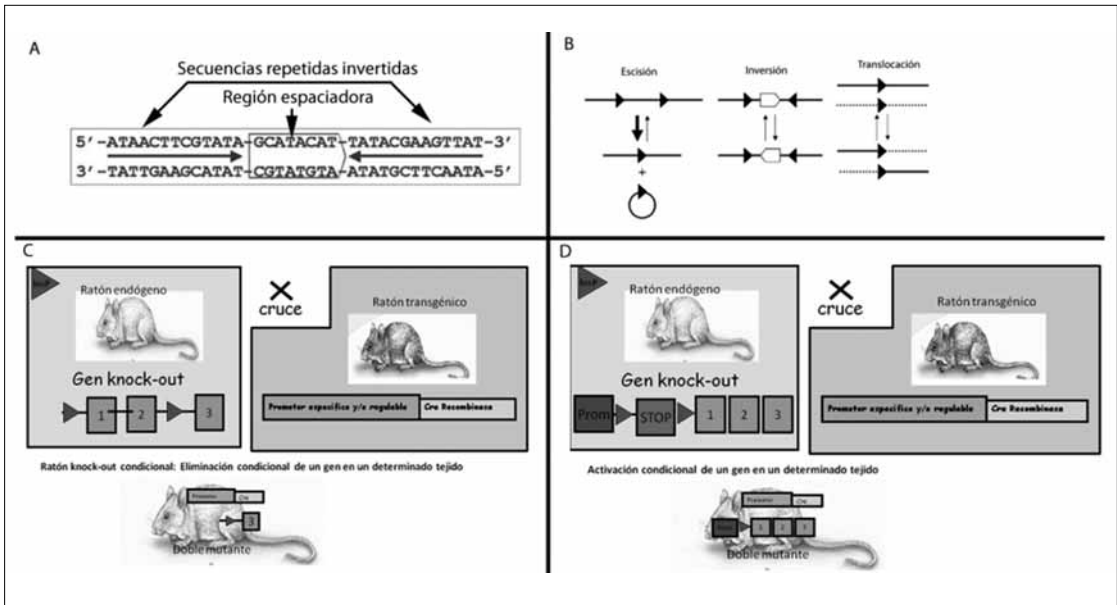


Figura 2: Estrategia CRE-LoxP y ejemplos de modelos condicionales complejos. A: Secuencia LoxP. B: Acciones de la CRE recombinasa. C: Estrategia para la eliminación condicional de un gen. D: Estrategia para la activación condicional de un gen.

nos permiten la modificación sitio-específica en el compartimento celular de elección; son los modelos condicionales. Estos modelos se basan en el uso y control espacio-temporal de las recombinasas sitio-específicas, de las cuales la más ampliamente utilizada es la CRE recombinasa del bacteriófago P1. Esta recombinasa reconoce unas secuencias específicas llamadas LoxP, de tal manera que escinde o invierte el DNA hallado entre dos de estas secuencias LoxP (Fig. 2). Mediante este sistema CRE-LoxP podemos insertar las secuencias LoxP en dos intrones diferentes, para escindir varios exones e impedir la correcta transcripción del gen en el compartimento celular que queramos y cuando queramos. Para esto necesitamos cruzar el ratón “loxeado” con un ratón que exprese la CRE recombinasa, bajo un promotor condicional y/o específico de tejido. Otra posibilidad es infectar el tejido diana del ratón “loxeado” con un virus que exprese la CRE recombinasa; en este caso lo habitual es utilizar un adenovirus. Por otro lado, estas mismas estrategias pueden ser utilizadas para la activación de oncogenes. En este sentido, mediante RH introducimos secuencias LoxP en células ES, flanqueando una secuencia STOP, que impide la expresión del oncogén. A continuación, la presencia de CRE escindiría la secuencia STOP y se transcribiría el oncogén dónde y cuándo queramos (Fig. 2).

Como podemos observar, los modelos son cada vez más complejos con el objeto de simular la situación humana, y a buen seguro seguiremos trabajando para conseguirlo en estos próximos años.

## REFLEXIONES SOBRE EL USO DE MODELOS DE RATÓN EN INVESTIGACIÓN EN CÁNCER

Nuestro conocimiento sobre el cáncer ha ido íntimamente ligado al ratón, progresando a través de diferentes fases y aumentando su complejidad, desde el trasplante de tumores humanos al ratón inmuno-deficiente (conocidos como ensayos “xenograft”), la inducción de tumores con carcinógenos químicos o virus, hasta la creación de cada vez más complejos modelos de ratón modificados genéticamente. Cada una de estas aproximaciones tiene sus ventajas y desventajas, y es importante elegir bien el sistema que vamos a utilizar para resolver las distintas cuestiones.

Aún existen barreras difíciles de solventar, ya que el cáncer humano surge -o creemos que surge- en el contexto de una única célula, que es la que origina el tumor. En este sentido, nuestros modelos distan aún de esta situación, ya que somos capaces de expresar la mutación/es en un conjunto de células determinado y regulando la misma espacio-temporalmente, pero no en una única célula, lo que nos aleja un poco de la situación fisiológica.

Pese a estas salvedades es aceptado por todos que los nuevos modelos de RMG son la mejor herramienta para explorar facetas del cáncer humano que serían imposibles de realizar clínicamente; sin embargo, no debemos olvidar que pese a nuestras semejanzas, seguimos siendo organismos diferentes. Aún así ésta parece la más válida de las aproximaciones, y seguro que este pequeño roedor seguirá siendo protagonista en las próximas décadas, dando grandes alegrías a la comunidad científica.

## BIBLIOGRAFÍA

- AGUIRRE AJ *et al.* *Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma.* Genes Dev. 2003; 17: 3112–3126.
- ANDRESSOO JO *et al.* *An Xpd mouse model for the combined xeroderma pigmentosum/Cockayne syndrome exhibiting both cancer predisposition and segmental progeria.* Cancer Cell 2006; 10: 121–132.
- CHIN L *et al.* *Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance.* Nature 1999; 400: 468–472.
- COLNOT S *et al.* *Liver-targeted disruption of Apc in mice activates catenin signaling and leads to hepatocellular carcinomas.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004; 101: 17216–17221.
- DERKSEN, PW *et al.* *Somatic inactivation of E-cadherin and p53 in mice leads to metastatic lobular mammary carcinoma through induction of anoikis resistance and angiogenesis.* Cancer Cell 2006; 10: 437–449.
- DINULESCU DM *et al.* *Role of K-ras and Pten in the development of mouse models of endometriosis and endometrioid ovarian cancer.* Nature Med. 2005; 11: 63–70.
- EDELMANN W *et al.* *Mutation in the mismatch repair gene Msh6 causes cancer susceptibility.* Cell 1997; 91: 467–477.

- HINGORANI SR *et al.* *Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice.* *Cancer Cell* 2005; 7: 469–483.
- IZERADJENE K *et al.* *Kras(G12D) and Smad4/Dpc4 haploinsufficiency cooperate to induce mucinous cystic neoplasms and invasive adenocarcinoma of the pancreas.* *Cancer Cell* 2007; 11: 229–243.
- JACKSON EL *et al.* *Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras.* *Genes Dev.* 2001; 15: 3243–3248.
- JONKERS J *et al.* *Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer.* *Nature Genet.* 2001; 29: 418–425.
- KIM MJ *et al.* *Cooperativity of Nkx3. 1 and Pten loss of function in a mouse model of prostate carcinogenesis.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99: 2884–2889.
- MEUWISSEN R *et al.* *Induction of small cell lung cancer by somatic inactivation of both Trp53 and Rb1 in a conditional mouse model.* *Cancer Cell* 2003; 4: 181–189.
- MO L *et al.* *Hyperactivation of Ha-ras oncogene, but not Ink4a/Arf deficiency, triggers bladder tumorigenesis.* *J. Clin. Invest.* 2007; 117: 314–325.
- OPITZ OG *et al.* *A mouse model of human oral-esophageal cancer.* *J. Clin. Invest.* 2002; 110: 761–769.
- OSHIMA H *et al.* *Carcinogenesis in mouse stomach by simultaneous activation of the Wnt signaling and prostaglandin E2 pathway.* *Gastroenterology* 2006; 131: 1086–1095.
- PEREZ-CARO M *et al.* *Cancer induction by restriction of oncogene expression to the stem cell compartment.* *EMBO J.* 2009; 28: 8–20.
- REILLY KM *et al.* *Nf1;Trp53 mutant mice develop glioblastoma with evidence of strain-specific effects.* *Nature Genet.* 2000; 26: 109–113.
- SANSOM OJ *et al.* *Apc deficiency predisposes to renal carcinoma in the mouse.* *Oncogene* 2005; 24: 8205–8210.
- SANSOM OJ *et al.* *Loss of Apc allows phenotypic manifestation of the transforming properties of an endogenous K-ras oncogene in vivo.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006; 103: 14122–14127.
- SANTONI-RUGIU E *et al.* *Evolution of neoplastic development in the liver of transgenic mice co-expressing c-myc and transforming growth factor.* *Am. J. Pathol.* 1996; 149: 407–428.
- TENG Y *et al.* *Synergistic function of Smad4 and PTEN in suppressing forestomach squamous cell carcinoma in the mouse.* *Cancer Res.* 2006; 66: 6972–6981.
- WANG S *et al.* *Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer.* *Cancer Cell* 2003; 4: 209–221.
- WU R *et al.* *Mouse model of human ovarian endometrioid adenocarcinoma based on somatic defects in the Wnt/ -catenin and PI3K/Pten signaling pathways.* *Cancer Cell* 2007; 11: 321–333.
- XIAO A *et al.* *Somatic induction of Pten loss in a preclinical astrocytoma model reveals major roles in disease progression and avenues for target discovery and validation.* *Cancer Res.* 2005; 65: 5172–5180.
- ZENDER L *et al.* *Identification and validation of oncogenes in liver cancer using an integrative oncogenomic approach.* *Cell* 2006; 125: 1253–1267.
- ZHOU Z *et al.* *Synergy of p53 and Rb deficiency in a conditional mouse model for metastatic prostate cancer.* *Cancer Res.* 2006; 66: 7889–7898.



# APLICACIÓN DE MODELOS MURINOS PARA EL ESTUDIO DE TERAPIAS ANTI-ANGIOGÉNICAS

*María del Mar Martínez Lozano  
Oriol Casanovas Casanovas*

*Laboratorio de Investigación Traslacional  
Institut Català d'Oncologia – IDIBELL*

Los modelos murinos de cáncer son de gran utilidad para el estudio de mecanismos moleculares y de respuesta a los nuevos tratamientos dirigidos contra moléculas ('targeted therapies'). Concretamente, su capacidad predictiva de respuesta a los diferentes tratamientos en la clínica ha sido ampliamente demostrada en varias publicaciones científicas (Abrams et al., 2003; Shaked et al., 2005).

En el "Laboratorio de Recerca Traslacional" de "l'Institut Català d'Oncologia", se ha desarrollado un modelo de tumores pancreáticos humanos implantados ortotópicamente en el páncreas de ratones atímicos, que consta de 10 líneas tumorales independientes que representan un amplio espectro de los diversos tipos histológicos más frecuentes en la clínica (G. Capellà y M. Morell, resultados no publicados).

Otro modelo empleado en este laboratorio, son ratones transgénicos que desarrollan tumores de los islotes pancreáticos (modelo RIP1-Tag2), y que se utilizan como modelo prototípico para el estudio de la respuesta a diferentes tratamientos experimentales.

El páncreas es un órgano en el que coexisten el tejido exocrino, compuesto por células que forman acinos y ductos (segregan bicarbonato, carboxipeptidasas, amilasa, tripsina, ribonucleasas y lipasas) que intervienen en la digestión del bolo alimenticio, y el tejido endocrino que se organiza en islotes o de forma difusa, compuesto por 5 tipos celulares: células secretoras de glucagón, insulina, somatostatina, polipéptido pancreático y de ghrelin.

Los tumores de los islotes pancreáticos pertenecen al grupo de los tumores neuroendocrinos gastroenteropancreáticos (TNGEP), tumores poco fre-

cuentes, con una incidencia inferior al 2.2/100.000 habitantes/año. Globalmente, son más frecuentes en mujeres y en población de color. Los TNGEP constituyen menos del 2% de todos los tumores gastrointestinales malignos.

## **MODELO MURINO DE TUMORES DE LOS ISLOTES PANCREÁTICOS (RIP1-TAG2)**

En 1985, Douglas Hanahan combinó el gen de rata de la insulina con la región temprana del SV40, produciendo el transgén RIP1-Tag2, que introdujo en ratones de la cepa C57/Bl6, genéticamente idénticos. La elección de la región temprana hacía posible inducir proliferación y formación de tumores, y usar anticuerpos contra el antígeno T para detectar su expresión.

Los oncogenes virales transportados por SV40 perturban la función de los genes supresores de tumores p53 y Rb, induciendo así a las células a entrar en un mecanismo de transformación. Aunque la expresión del oncogén empieza durante el desarrollo embrionario, los islotes de Langerhans inicialmente tienen una apariencia anatómica e histológica normal. A las 5 semanas de edad, empiezan a aparecer islotes hiperplásicos y displásicos, llegando a tener este fenotipo el 50% de los islotes a la edad de 10 semanas. Los islotes angiogénicos se reconocen fácilmente por los vasos sanguíneos dilatados y las micro-hemorragias que presentan; empiezan a surgir alrededor de las 6 semanas de edad, y representan el 10% de los islotes a las 10. La formación de tumores se inicia a las 12 semanas de edad y representa el 2-4% de todos los islotes a las 14 semanas. Los ratones RIP1-Tag2 (Fig. 1) mueren aproximadamente a las 15-16 semanas de-

bido a la hiperinsulinemia provocada por los tumores (Fig. 2).

Estos tumores tienen una extraordinaria vascularización con una alta expresión de varias moléculas pro-angiogénicas (Casanovas *et al.*, 2005).

## TERAPIAS EXPERIMENTALES EN EL MODELO MURINO TRANSGÉNICO

Las terapias experimentales en ratones transgénicos RIP1-Tag2 inmunocompetentes van encaminadas a la realización de los siguientes estudios:

- Estudios de los mecanismos moleculares y celulares de la tumorigénesis.
- Evaluación de nuevas estrategias terapéuticas anti-tumorales, principalmente basadas en fármacos contra la vasculatura (anti-angiogénicos).

## TERAPIA ANTI-ANGIOGÉNICA

La implicación de la formación de nuevos vasos (angiogénesis) en la progresión tumoral, y la utilización de ésta como diana terapéutica, han sido extensamente descritas en la literatura y ha culminado con la realización de exitosos ensayos clínicos con terapias anti-angiogénicas en ciertos tipos de cáncer (revisado en Folkman, 1992; Kerbel, 2000).

La principal diana de las terapias anti-angiogénicas es el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y su principal receptor (VEGFR2/Flk/KDR), como típica vía de señalización en la angiogénesis tumoral. El factor VEGF fue descrito en 1983 por Senger y cols., por su pa-

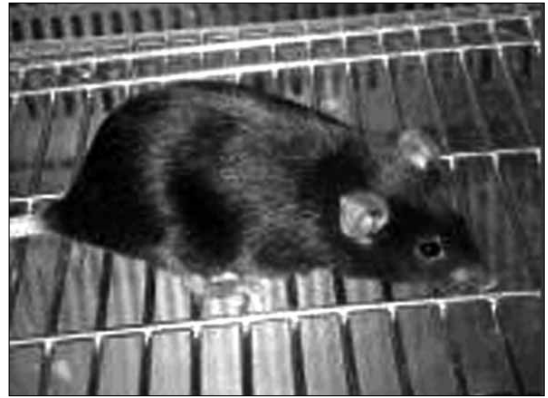


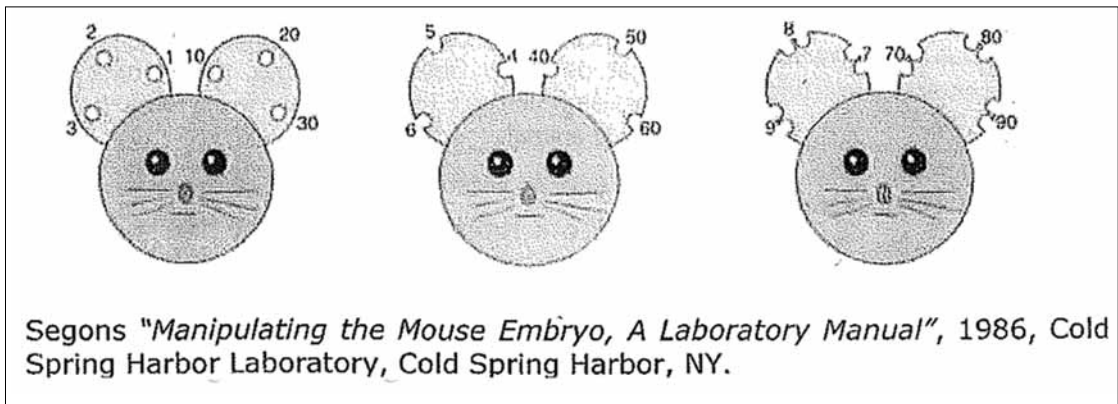
Figura 1. Ratón transgénico RIP1-Tag2, hembra de 14 semanas de edad. Los animales transgénicos no presentan ningún signo físico aparente de los tumores que están creciendo en su interior.

pel en la permeabilidad vascular. Posteriormente se describió su función de mediador de la proliferación de las células endoteliales y la neo-angiogénesis. El bloqueo de esta vía de señalización (VEGF-VEGFR2), inhibe la angiogénesis e impide la correcta vascularización del tumor lo que, a su vez, disminuye el aporte de sangre y nutrientes e inhibe el crecimiento tumoral (Folkman, 1992).

## METODOLOGÍA

El estudio de la efectividad anti-tumoral de los fármacos anti-angiogénicos es especialmente interesante en los modelos tumorales RIP1-Tag2, puesto que estos presentan la formación espontánea de tumores endógenos a partir de un tejido normal, lo cual es mucho más parecido al desarrollo de tumores en humanos.

Los animales se identificaran individualmente mediante marcaje en las orejas según este sistema:



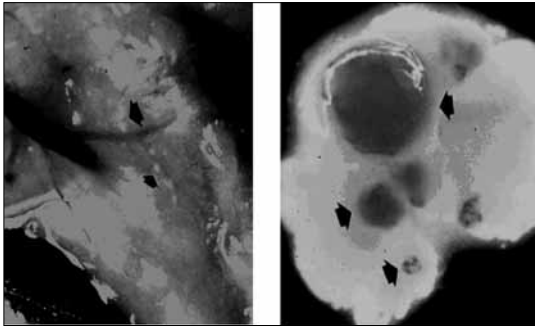


Figura 2. Diferencias anatómicas del páncreas en un ratón RIP1-Tag2 (B) y en un ratón no transgénico (A). Las flechas indican los islotes de Langerhans en el animal no transgénico, y tumores sólidos altamente vascularizados e islotes angiogénicos en el ratón RIP-Tag2.

La administración de los diferentes fármacos se realiza por vía oral (“gavage”), subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa, utilizando los métodos estándar y siempre siguiendo las normativas y límites aceptados por el CEEA-IDI-BELL (según normativa vigente).

Durante los tratamientos experimentales, la monitorización de los animales es una de las prioridades, concretamente para detectar precozmente la aparición de signos de alteración del bienestar de los animales, y efectos deseados y adversos de las drogas en estudio. Para los experimentos, se obtienen varios tejidos y fluidos de los ratones. Los fluidos se obtienen después de la anestesia de los animales con isofluorano, y los tejidos (p.e. páncreas, hígado, ganglios linfáticos, pulmones, corazón,

etc.) se obtienen post-mortem, tras la eutanasia con CO<sub>2</sub> o sobredosis de anestésico (pentobarbital sódico 60mg/Kg).

La eficacia de las diferentes drogas se valora en función de la disminución del volumen tumoral. El volumen tumoral (en mm<sup>3</sup>) se medirá en el páncreas fresco, una vez separado el tejido acinar, utilizando la fórmula siguiente: [volumen = 0.52 x (ancho) 2 x (largo)]

Debido a la variabilidad inter-animal de la progresión tumoral, y para poder obtener resultados estadísticamente significativos, el número de animales en estudio será de 15 por tipo de tratamiento, siempre incluyendo un grupo control no tratado o tratado con solución vehículo (sin fármaco).

Para evitar padecimientos innecesarios de los animales se llevarán a término dos medidas:

- 1) Tratamiento paliativo de la hiperinsulinemia (e hipoglucemia) para el bienestar y supervivencia de los animales RIP1-Tag2, que constará en la administración de sacarosa en el agua de bebida (5% sacarosa).
- 2) Monitorización de los animales para detectar precozmente la aparición de signos de alteración del bienestar de los animales y efectos deseados y adversos de las drogas en estudio. Por ejemplo: pérdida de peso, estado y color del pelo, estado de alerta y actividad del animal, caquexia, encorvamiento de la espina dorsal,

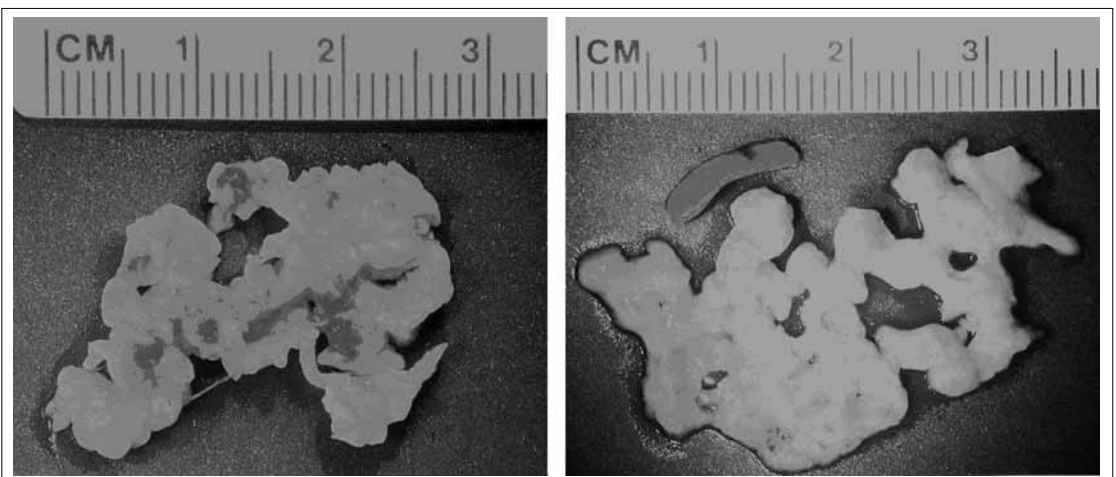


Figura 3. Observación macroscópica anatomopatológica del páncreas en un ratón RIP1-Tag2 control no tratado (izquierda), y en un ratón tratado con terapia antiangiogénica (derecha). En el animal control se observan tumores sólidos altamente vascularizados, mientras que en el animal tratado los tumores se han reducido drásticamente y han perdido su alta vascularización.

etc., siguiendo estrictamente el Protocolo de Supervisión en Oncología Experimental Servicio de Estabulario del IDIBELL. Los animales que presenten criterios de punto final serán sacrificados siguiendo los métodos establecidos y aprobados por el CEEA-IDIBELL: eutanasia con método químico o físico: con CO<sub>2</sub>, sobredosis de anestésico (pentobarbital sódico 60 mg/Kg) o dislocación cervical.

## RESULTADOS

Varias drogas anti-angiogénicas se han evaluado en el modelo de insulinoma del ratón transgénico RIP1-Tag2.

En concreto, se han testado varias pequeñas moléculas químicas que inhiben el VEGFR2/KDR (SU5416, SU10944 y SU11248), y un anticuerpo monoclonal que bloquea la activación de VEGFR2 (DC101), con marcado efecto anti-angiogénico en la densidad de microvasos, la proliferación de las células endoteliales y con marcada actividad anti-tumoral con incremento de la apoptosis celular (Fig. 3; Casanovas et al., 2005).

Aunque la terapia anti-angiogénica es clínicamente efectiva en ciertos tipos de cáncer, uno de los efectos importantes es la aparición de resistencias, basadas principalmente en cambios en el microentorno tumoral que acaban iniciando una adaptación del tumor a la terapia anti-angiogénica. Se han descrito varios mecanismos de resistencia al tratamiento que implican desde una adaptación a la hipoxia intra-tumoral, hasta la revascularización de los tumores por vías pro-angiogénicas alternativas no inhibidas por las terapias (Carmeliet, 2005; Casanovas et al., 2005; Glade-Bender et al., 2004).

En concreto, los resultados obtenidos en nuestro laboratorio con este modelo murino indican que existen dos fases de respuesta a los tratamientos contra el receptor 2 de VEGF (VEGFR2, KDR): una primera fase de inhibición de la progresión tumoral (éxtasis tumoral), y una clara fase de resistencia o evasión al tratamiento con re-crecimiento vascular y tumoral (Casanovas et al., 2005). Así, nuestros resultados implican un mecanismo de resistencia del tumor por sobreexpresión de varios factores pro-angiogénicos, que acaban promoviendo una revascularización secundaria que permite un recrecimiento del tumor (Casanovas et al., 2005). Estos resultados son de especial interés por

sus consecuencias sobre la progresión tumoral y las implicaciones que se derivan en los actuales ensayos clínicos con anti-angiogénicos.

## UTILIDAD DEL MODELO MURINO: APLICACIÓN CLÍNICA

Como hemos descrito, los modelos murinos de cáncer son de gran utilidad para el estudio de mecanismos moleculares y de respuesta a los tratamientos antitumorales, por su capacidad predictiva de respuesta a los diferentes tratamientos en la clínica y, en concreto, de las terapias antiangiogénicas.

La evidencia clínica de la importancia de la aplicación de estas terapias proviene de ensayos clínicos con moléculas anti-angiogénicas, como por ejemplo el uso del anticuerpo bloqueante de VEGF (bevacizumab, Avastin®) en combinación con quimioterapia en cáncer colorrectal metastático (Hurwitz, 2004; Hurwitz et al., 2005), en cáncer de mama metastático (Millar, 2004; Rugo, 2004) y otros tipos de cáncer (revisado en de Gramont et al., 2005). Más recientemente, inhibidores químicos del receptor 2 de VEGF (VEGFR2) como el sunitinib o el sorafenib han demostrado eficacia clínica en monoterapia de cáncer de riñón metastático y han sido aprobados en primera línea para esta patología.

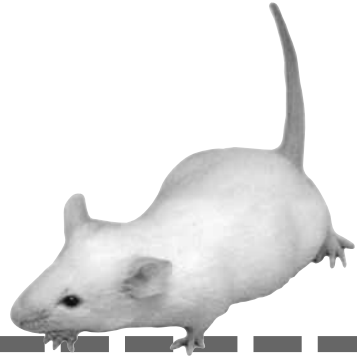
## BIBLIOGRAFÍA

- ABRAMS TJ, MURRAY LJ, Pesenti E, et al. *Pre-clinical evaluation of the tyrosine kinase inhibitor SU11248 as a single agent and in combination with "standard of care" therapeutic agents for the treatment of breast cancer.* Mol. Cancer Ther. 2003; 2: 1011-1021.
- CARMELIET P. *Angiogenesis in life, disease and medicine.* Nature 2005; 438: 932-936.
- CASANOVAS O., Hicklin D, Bergers G et al. *Drug resistance by evasion of anti-angiogenic targeting of VEGF signaling in late stage pancreatic islet tumors.* Cancer Cell 2005; 8: 299-309.
- de GRAMONT A, VAN CUTSEM E. *Investigating the potential of bevacizumab in other indications: metastatic renal cell, non-small cell lung, pancreatic and breast cancer.* Oncology. 2005; 69 Suppl 3: 46-56.
- FOLKMAN J. *The role of angiogenesis in tumor growth.* Sem. Cancer Biol. 1992; 3: 65-71.

- GLADE BENDER J, COONEY EM, KANDEL JJ, *et al.* Vascular remodeling and clinical resistance to antiangiogenic cancer therapy. *Drug Resist Updat.* 2004; 7: 289-300.
- HURWITZ H. *Integrating the anti-VEGF-A humanized monoclonal antibody bevacizumab with chemotherapy in advanced colorectal cancer*". *Clin. Colorectal Cancer* 2004; 4 Suppl 2: S62-S68.
- HURWITZ H, KABBINAVAR F. *Bevacizumab combined with standard fluoropyrimidine-based chemotherapy regimens to treat colorectal cancer.* *Oncology* 2005; 69 Suppl 3: 17-24.
- KERBEL RS. *Tumor angiogenesis: past, present and the near future.* *Carcinogenesis* 2000; 21: 505-515.
- MILLER KD. *Recent translational research: antiangiogenic therapy for breast cancer - where do we stand?* *Breast Cancer Res.* 2004; 6: 128-132.
- RUGO HS. *Bevacizumab in the treatment of breast cancer: rationale and current data.* *Oncologist* 2004; 9 Suppl 1: 43-49.
- SHAKED Y, BERTOLINI F, MAN S, *et al.* *Genetic heterogeneity of the vasculogenic phenotype parallels angiogenesis; Implications for cellular surrogate marker analysis of antiangiogenesis*". *Cancer Cell* 2005; 7: 101-111.



# 3 TÉCNICAS



**ESTA SECCIÓN, TIENE COMO OBJETIVO DESCRIBIR DE FORMA SINTÉTICA Y PRÁCTICA, TODO TIPO DE TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.**

**TODOS LOS SOCIOS, ESPECIALMENTE TÉCNICOS, ESTÁN INVITADOS A PARTICIPAR EN ELLA**

**CONTACTO: MARÍA GRANADA PICAZO; [mgpicazo@sescam.jccm.es](mailto:mgpicazo@sescam.jccm.es)**

## TÉCNICAS QUIRÚRGICAS EN UN MODELO DE CÁNCER DE COLON EN LA RATA

**Julia M. Samos Juárez**

*Centro de Experimentación Animal, Universidad de Castilla-La Mancha*

Se han desarrollado multitud de modelos animales para el estudio de la enfermedad cancerosa, mediante los que se intenta entender las distintas etapas del desarrollo tumoral, así como explorar diferentes vías terapéuticas.

La utilización de modelos animales en condiciones de alojamiento controladas, permite estandarizar los resultados obtenidos, ya que se minimizan tanto factores endógenos (edad, alteración genética del tumor, etc.), como exógenos (nutrición, condiciones ambientales, etc.).

El modelo que presentamos es de cáncer de colon, ortotópico, en el que se emplean animales inmunocompetentes (ratas de la cepa BD-IX), y células de adenocarcinoma de colon de la línea

DHD-K12/TRb, cuyo origen estuvo en animales de la misma especie y estirpe. La inoculación de estas células se realiza en la pared cecal, lo que da lugar a la formación de tumor en el lugar de implantación, y el posterior desarrollo de metástasis pulmonares.

Las ventajas de utilizar este modelo animal son las siguientes:

- El periodo transcurrido entre la inoculación de células tumorales y el desarrollo de un tumor, microscópicamente visible, es bajo.
- Se genera un único foco tumoral, frente a los múltiples que aparecen en los modelos desarrollados por la administración de carcinógenos.

- Al utilizar animales inmunocompetentes, la evolución de la enfermedad y el desarrollo de metástasis se asemeja más a la evolución de un cáncer humano.

## TÉCNICA DE INOCULACIÓN DE LAS CÉLULAS TUMORALES

La técnica del inóculo tumoral es un procedimiento sencillo y relativamente corto, descrito previamente en la bibliografía (García-Olmo et al., 1998).

El animal se anestesia con ketamina (75mg/kg) y xilacina (10mg/kg) por vía intraperitoneal (ip). Seguidamente, se coloca en una placa calefactora, para prevenir la hipotermia, y cuando pierde el reflejo de estación, se le rasura toda la zona abdominal y se impregna de povidona yodada.

A continuación, se exterioriza el ciego a través de una laparotomía. Seguidamente, se introduce una aguja de 25G, conectada a la jeringuilla que contiene el inóculo, en paralelo al propio ciego y a unos 0,5 cm de la válvula ileocecal. Una vez que la aguja ha penetrado 3-4 mm, se inyecta el inóculo lentamente, pudiéndose apreciar a la vez una elevación producida por la separación de las capas de la pared cecal. Esto es un buen indicador de que el inóculo se ha realizado con éxito (Fig. 1).

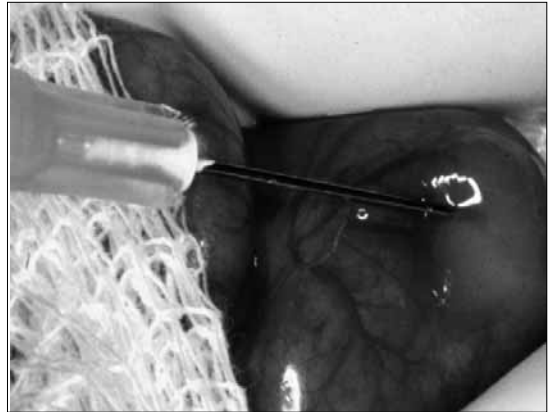


Figura 1.  
Inyección del inóculo de células tumorales en el ciego de la rata.



Figura 2.  
Imagen del tumor a las 3 semanas de la inoculación de células tumorales.

## EXÉRESIS TUMORAL

En nuestros estudios, tres semanas después de la inoculación procedemos a la extirpación quirúrgica del tumor (Fig. 2), para lo que empleamos dos tipos de cirugía:

- Resección local:** extirpación del tumor y el tejido circundante.
- Ceectomía:** extirpación del ciego.

El objetivo de realizar dos tipos de procedimientos quirúrgicos es determinar la posible implicación de la agresividad de la técnica quirúrgica en la evolución tumoral y el desarrollo de metástasis.

En los dos tipos de intervenciones, la preparación del animal y la anestesia se realizan de igual forma que para la inyección del inóculo, pero administramos además antibioterapia preventiva, que consiste en 1 ml de Imipenem (Tienam<sup>®</sup>, 5mg/ml)



Figura 3.  
Resección local del tumor.



Figura 4.  
Imagen de la zona de sutura tras la resección local del tumor.

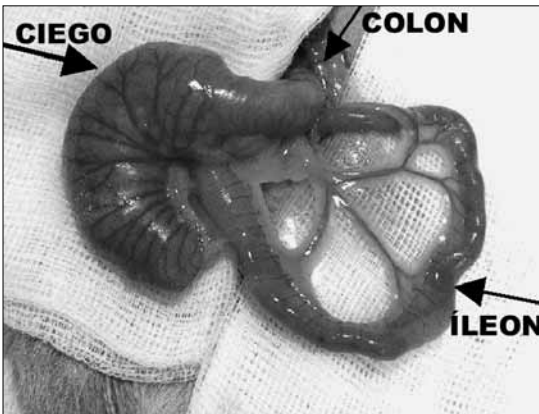


Figura 5.  
Imagen de la vascularización y anatomía de la zona.



Figura 6.  
Imagen de la anastomosis ceco-ílica tras la cecectomía.

y 2 ml de Metronidazol (Metronidazol Normon EFG, 5mg/ml), por vía ip. Este tratamiento se aplica ya que, en ambas intervenciones, existe la posibilidad de salida de contenido intestinal a la cavidad abdominal.

Ya en la mesa de operaciones, también calefaccionada, se realiza una laparotomía media de unos 2 cm de longitud, se expone el ciego, y se comprueba la existencia de tumor (Fig. 2). En este momento es donde se realiza uno u otro tipo de cirugía:

**A. Resección local del tumor:** se practica una incisión rodeando a la masa tumoral, dejando 1 mm de margen aproximadamente (Fig. 3). Tras la escisión de la pieza, se sutura el defecto con puntos sueltos empleando Vycril® de 6/0 (Fig. 4). Seguidamente se lava la zona con solución salina estéril para eliminar los restos de contenido intestinal que quedan adheridos a la pared intestinal, introduciéndose a continuación el ciego en la cavidad abdominal.

**B. Cecectomía:** junto con el ciego, se expone parte del ileon y colon, y la zona de mesenterio correspondiente (Fig. 5). Es importante observar la vascularización de la zona e identificar y ligar las distintas ramificaciones de la arteria y vena mesentérica craneal que son necesarias para conseguir una buena hemostasia (el número de ligaduras varía, ya que la anatomía de esta vascularización es diferente entre animales).

Seguidamente, en las zonas elegidas para la sección de ileon y colon, se colocan dos pinzas hemostáticas y se secciona el intestino entre ambas. Las zonas de sección están situadas a unos 0,5 cm de la salida del ciego en colon, y a unos 1,5 cm de la válvula ileocecal en ileon. Estas distancias son aproximadas, ya que dependen de la anatomía propia de cada animal.

Completada la resección del ciego, el siguiente paso es unir ambos extremos de intestino, mediante una anastomosis termino-terminal con puntos sueltos e inversión de los bordes intestinales. Para ello, y después de limpiar los cabos de intestino con solución salina estéril, se colocan dos puntos de referencia, con Vycril de 5/0 en los ángulos superior e inferior.

A continuación, se completa la línea de sutura anterior con tres puntos sueltos y, terminada ésta, se completa la sutura de la cara posterior de igual modo (Fig. 6). Siempre se procura que no quede mucosa interpuesta en los bordes de la sutura, ya que dificultaría una buena cicatrización. Por último se comprueba el cierre hermético y la existencia de un paso adecuado de material intestinal a través de la anastomosis.

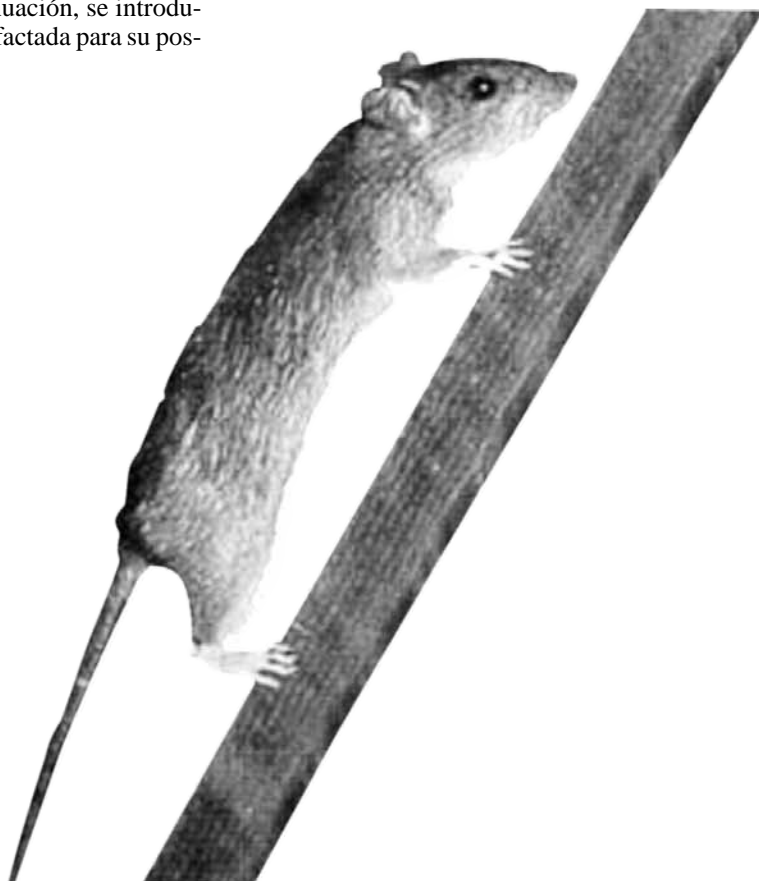
Finalmente se lava de manera abundantemente toda la zona con solución salina estéril, para eliminar restos de contenido intestinal, reintroduciendo las asas intestinales inmediatamente.

### FINALIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

El cierre de la cavidad abdominal se realiza en dos capas: la pared abdominal mediante sutura continua con Vycril® de 3/0, y la piel con puntos sueltos de seda de 3/0. A continuación, se introduce al animal en una cámara calefactada para su posterior recuperación.

### BIBLIOGRAFÍA:

GARCÍA-OLMO D, GARCÍA-RIVAS M, GARCÍA-OLMO DC, ATIÉNZAR M. *Orthotopic implantation of colon carcinoma cells provides an experimental model in the rat that replicates the regional spreading pattern of human colorectal cancer.* Cancer Lett. 1998; 132: 127-133.





# Presión POSITIVA

**ESTA SECCIÓN TIENE COMO OBJETIVO SER UNA FUENTE DE ACTUALIZACIÓN PROFESIONAL PARA LOS RESPONSABLES DE ANIMALARIOS.**

**TODOS LOS SOCIOS ESTÁN INVITADOS A PARTICIPAR ENVIÁNDONOS SUS ARTÍCULOS**

**CONTACTO: HERNÁN SERNA; [hserna@binaex.com](mailto:hserna@binaex.com)**

## ACREDITACIÓN AAALAC INTERNATIONAL, SÍMBOLO DE CALIDAD

**Luis Parra García**

*Centro de Investigación y Desarrollo Farmacéutico  
Grupo Ferrer, Barcelona*

### INTRODUCCIÓN

El aumento de la sensibilidad que la sociedad demuestra hacia la experimentación animal, y la necesidad de asumir un compromiso de responsabilidad hacia el bienestar de los animales, hace que nos planteemos cómo podemos y debemos mejorar los métodos que empleamos en nuestros programas de trabajo, para que no resulten obsoletos y, a la vez, no hieran la sensibilidad creciente de la sociedad.

Debemos tener una visión lo más amplia posible, para ser capaces de que nuestros estándares de trabajo sean revisados y mejorados continuamente, en la medida que sea posible.

No sólo en procedimientos de experimentación, sino también en el ámbito académico y en el de producción, cuanto mejor sea el uso que se les dé a los animales, mejor será el producto final obtenido.

### SISTEMAS DE CALIDAD

Disponemos de diferentes sistemas de calidad que pueden ser aplicados en cualquier actividad que implique el uso de animales de experimentación, destacando entre ellos las Normativas ISO (Organización Internacional para la Normalización), las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), y la acreditación por parte de la Asociación Internacional para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio (AAALAC International).

Si bien la acreditación AAALAC, podría no considerarse un sistema de calidad propiamente dicho, en la práctica y teniendo en cuenta lo que en nuestro caso significa el término “calidad”, es posible que sea la mejor acreditación que pueden obtener aquellos centros que trabajen con animales.

## CALIDAD

En principio, cada uno de nosotros tiene una manera de entender el término “calidad”, ya que no hay una definición unánimemente aceptada. No obstante, no debemos confundir “calidad” con lujos o niveles superiores a nuestras necesidades, sino que debemos buscar el mayor grado de satisfacción que nos permita cubrirlas.

En ocasiones, estas necesidades nos serán impuestas, ya que debemos cumplir exigencias legales; por ello, determinados estudios regulatorios deben realizarse bajo BPL (de obligado cumplimiento), mientras que en el ámbito productivo/comercial podrían cumplirse las ISO, que están enfocadas a satisfacer al comprador de un producto o servicio. En cualquier caso, no debemos olvidarnos del criterio ético que debemos aplicar en el uso de animales.

Por todo ello, es muy recomendable que hoy en día se disponga de algún sistema de calidad, que nos permita seguir mejorando y beneficie a todos los implicados: productores, investigadores, y a los propios animales.

Cabe matizar que, para que cualquier sistema de calidad funcione, tiene que ser considerado como una herramienta de trabajo. No debe ser únicamente el reconocimiento mediante un certificado o placa a colgar de nuestras paredes, sino que debe ayudar a mejorar nuestro programa general.

### CALIDAD EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO FARMACÉUTICO DEL GRUPO FERRER (CIDF)

Aunque todos los sistemas de calidad tienen sus ventajas e inconvenientes, en el CIDF entendimos que, para mantener unos estándares más allá de los meramente requeridos por la Ley, debíamos optar a la acreditación AAALAC.

El CIDF ya contaba con una Unidad de Garantía de Calidad (UGC), constituida en el año 1993. El CIDF fue certificado por la Autoridad Reguladora competente en el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Laboratorio desde sus inicios en España (1997), y ha revalidado su certificación periódicamente conforme a la legislación vigente.

Para nosotros, el hecho de tener ya un sistema de calidad, no implicaba no poder disponer de otro, sino todo lo contrario, ya que en muchas ocasiones es positiva la coexistencia de varios sistemas de calidad. En este sentido, la UGC del CIDF facilitó y ayudó en todo lo concerniente a documentación, desde procedimientos de trabajo, a documentación del personal, equipos e instalaciones.

### PARTICIPACIÓN EN LA ACREDITACIÓN AAALAC

La acreditación AAALAC, es una acreditación que se concede a la Institución. Es decir, no acredita animalarios, sino que acredita programas completos de cuidado y uso de animales de laboratorio, por lo que concierne e implica a todos los departamentos o secciones que utilicen a los animales como modelo experimental.

La convicción, compromiso y apoyo de la Dirección de cada centro, es imprescindible para la obtención de la acreditación. Debemos tener presente que la acreditación es voluntaria y, como tal, demuestra el compromiso que la Institución quiere dar a su programa de cuidado y uso de los animales que en ella se gestionan y que, como ya se ha comentado, va más allá de lo que la normativa exige.

Todas las personas que trabajan directamente con animales deberán cooperar y participar activamente para lograr este fin (investigadores, experimentadores, técnicos). Ello redundará positivamente no sólo en la Institución, sino también en los propios profesionales que trabajan en ella.

Es fundamental la participación de otros comités, departamentos o servicios del centro, como los de Ética, Mantenimiento o Prevención de Riesgos. De este modo, se pueden coordinar áreas del programa que pueden no estar directamente bajo la supervisión de los responsables de los estabularios, como el proceso de revisión ética, el mantenimiento de equipos/instalaciones, y el programa de seguridad y salud laboral.

La figura del veterinario no es sustituible por ninguna otra, y es imprescindible su aportación en todo el proceso. Debe tener formación complementaria para el cuidado y tratamiento de los animales de laboratorio, y disponer de programas definidos para todo lo concerniente a los animales de labora-

torio utilizados en el Centro. En el siguiente enlace encontraréis información al respecto: <http://quiro.uab.es/fisiologia-vet/anilab/master.html>

El éxito de este proyecto, que sólo es posible gracias al compromiso personal y al trabajo en equipo de todas las personas que trabajan directamente con animales, contribuye a reforzar de forma significativa la responsabilidad social corporativa, y la proyección social de los centros que participan en la obtención y mantenimiento de la acreditación.

## AAALAC INTERNATIONAL

De origen estadounidense, hace más de cuarenta años que instituciones de todo el mundo participan voluntariamente en la obtención de la acreditación.

Es precisamente la importancia internacional que actualmente se le otorga a la obtención de la acreditación AAALAC, lo que hace que se reconozca como un símbolo de calidad.

En EE.UU. es el sistema más importante para los animalarios, ya que esta acreditación es necesaria incluso para poder optar a algunos tipos de ayuda económica para la investigación.

Como bien indican en su página web, “es la única acreditación internacional para programas de cuidado y uso de animales”; pero, desde mi punto de vista, lo más importante es que son los propios profesionales -expertos de todo el mundo en el cuidado y uso de los animales-, los que nos van a evaluar y en su caso acreditar, con la ayuda de los especialistas de los que se hacen acompañar en las visitas a los centros.

El órgano operativo es el Consejo de Acreditación, compuesto por profesionales e investigadores expertos que dirigirán la visita y cuyas conclusiones determinarán si se es merecedor de la acreditación. Durante la visita, se ayudan de profesionales ad hoc; se trata de consultores, normalmente especializados en algún área concreta, o perteneciente a distintas áreas geográficas.

En el enlace [www.aaalac.org/spanish/index.sp.cfm](http://www.aaalac.org/spanish/index.sp.cfm) encontraréis diversa información, como la que se menciona a continuación:

- Quién puede solicitar la acreditación AAA-LAC: requisitos para poder solicitarla.
- Cómo se debe solicitar la acreditación AAA-LAC: formulario y diversa información necesaria para completar la descripción del programa de animales. Incluye una “Evaluación de estado del programa” (PSE), mediante cuya cumplimentación podemos localizar puntos débiles en nuestros programas, y sugerencias para mejorarlos o corregirlos.
- Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio: referencia principal utilizada para evaluar el programa de animales (se puede solicitar una guía gratuita).
- Política y responsabilidades institucionales, incluyendo el control ético y el programa de seguridad y salud laboral.
- Entorno animal: estabulación, higiene, cuidados, etc.
- Cuidado médico veterinario.
- Instalaciones.
- Consejo de acreditación y consultores/especialistas ad hoc: composición del Consejo y de los diferentes órganos de consulta, método de evaluación del programa, y formas de ayuda que prestan los consultores/especialistas ad hoc en dicha evaluación.
- Preguntas frecuentes sobre AAALAC International: principales aclaraciones a las dudas que pueda ofrecernos AAALAC International.

### OFICINA PARA EUROPA DE AAALAC:

Javier Guillen, D.V.M

*Senior Director and Director of European Activities*

*AAALAC International*

*E-mail: [jguillen@aaalac.org](mailto:jguillen@aaalac.org)*

### INSTITUCIONES ACREDITADAS

#### A NIVEL NACIONAL

- GlaxoSmithKline R&D S.L. Tres Cantos, Madrid.
- Institut d'Investigació Biomedica de Bellvitge (IDIBELL). Barcelona.
- CIC bioGUNE. Derio, Vizcaya.
- Centro de Investigación y Desarrollo Farmacéutico del Grupo Ferrer (CIDF). Barcelona.

ESPECIALISTAS *ad hoc*

- Juan Martín-Caballero, D.V.M., Ph.D. Director of Laboratory Animal Units. Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona-PRBB.
- Antonio E. Martínez, D.V.M., Ph.D. Head, Laboratory Animal Science Department. DDW Center. GlaxoSmithKline R&D S.L.

- Joana Visa, D.V.M., Ph.D. Director, Animal Facility. Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL).

A ellos, se sumará este año José María Orellana, D.V.M., Ph.D. Veterinario Titular Centro de Experimentación Animal. Universidad de Alcalá de Henares.

## IMPORTANCIA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL EN LA REDUCCIÓN DEL USO DEL ANIMAL DE LABORATORIO

---

*Marcel·lí Carbó*

*Palau Pharma S.A., Barcelona*

Este año se cumple el 50º aniversario la primera edición del libro “The Principles of Human Experimental Techniques” ([http://altweb.jhsph.edu/publications/humane\\_exp/het-toc.htm](http://altweb.jhsph.edu/publications/humane_exp/het-toc.htm)), donde W.R.S. Russell y R.L. Burch definieron las siglas 3R (reemplazo, refinamiento y reducción): refinar los procedimientos para minimizar el dolor y el sufrimiento; reemplazar los modelos “in vivo” por modelos “in vitro”, en la medida de lo posible; y finalmente reducir el número de animales empleados en los experimentos al mínimo para obtener resultados científicamente relevantes.

La Directiva Europea es clara en lo referente a las 3R: “(...) Al elegir entre diversos experimentos se seleccionarán aquellos que utilicen el menor número de animales, que afecten a especies con el grado más bajo de sensibilidad neurofisiológica, que causen el menor dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero y que puedan proporcionar los resultados más satisfactorios” (Directiva 86/609/EEC; artículo 7.3). Por este motivo, la justificación del número de animales en los procedimientos experimentales hay que considerarla como una parte imprescindible del procedimiento, que

debe ser revisada de forma crítica por los comités éticos de experimentación animal.

El concepto de reducción es relativamente simple, pero conseguir una reducción eficaz no es tan sencillo como a priori podría parecer. Algunos autores, como Festing (1994), estiman que un tercio de los experimentos publicados se han realizado con un número excesivo de animales. En cualquier caso, los investigadores, al redactar su procedimiento, deben justificar el número de animales a partir de datos previamente obtenidos en su propio laboratorio, o a partir de información bibliográfica, con el objetivo de obtener resultados científicamente válidos con el mínimo de animales.

Los aspectos más determinantes para la obtención de unos resultados científicamente válidos dependen del diseño experimental. En la Tabla 1 se enumeran los aspectos más relevantes que todo diseño experimental debe incluir. El número de animales que va a emplearse en los procedimientos experimentales (tamaño muestral), es uno de los aspectos del diseño. Una planificación completa y estructurada del estudio, incluyendo el cálculo del

tamaño muestral, nos permitirá un uso racional y eficaz del animal de experimentación.

## VARIABILIDAD DEL SISTEMA EXPERIMENTAL

El animal de laboratorio, como sistema experimental, está sujeto a diferentes fuentes de variación que influyen de forma determinante en los experimentos. Conocer las fuentes de variación de nuestro sistema experimental es, de hecho, el aspecto más relevante para empezar a diseñar un experimento. Por un lado, encontramos unas fuentes de variación que el experimentador puede controlar y que muchos autores los denominan “efectos fijos” (especie, sexo, cepa, edad, lecho, dieta, tipo de célula, medio de cultivo, condiciones de cultivo, etc.); y otras, no controlables por el investigador, que denominaremos “efectos aleatorios” (“random effects”), como la variabilidad interindividual, el error en la medida no sistemático y la variabilidad debida al tiempo y a la ubicación (Festing et al., 2002).

Esta variación no controlada reduce el poder estadístico para detectar los efectos estudiados en un experimento. La forma de reducirla es escoger con cuidado el material experimental y realizar un buen diseño. Diseñar mejores experimentos, considerando repetir el experimento en diferentes condiciones, realizar experimentos sencillos, y obtener medidas fiables y objetivas son aspectos que no debemos olvidar.

## PRINCIPIOS BÁSICOS EN EL DISEÑO EXPERIMENTAL

A continuación se describen de forma resumida los aspectos más relevantes que hay que considerar en un diseño experimental:

### Unidad experimental

La unidad experimental es aquella a la que va a asignarse un tratamiento de forma aleatoria. Las unidades experimentales pueden ser jaulas, animales, órganos, etc. La unidad experimental ha de tener la misma probabilidad de ser asignada a los distintos tratamientos. Con frecuencia, la unidad experimental es el animal de experimentación, pero no siempre es así. Por ejemplo, si el efecto del “tratamiento A” administrado a los animales de la

“jaula 1” quiere compararse con el observado en los animales control de la “jaula 2”, entonces las unidades experimentales son las jaulas y no los animales.

No identificar correctamente las unidades de experimentales es uno de los errores más frecuentes en un diseño y provoca que el análisis estadístico que va a aplicarse carezca de sentido (Festing et al., 2002).

### Replicados

Los replicados tienen como objetivo reducir el efecto de la variación no controlada (incrementar la precisión) y cuantificar la incertidumbre. Una estimación tiene poco valor si no va acompañada de una medida de la incertidumbre asociada.

### Aleatorización

Los tratamientos han de estar asignados a las unidades experimentales de forma aleatoria, para que cada unidad experimental tenga la misma probabilidad de recibir cualquiera de los tratamientos. Es conveniente explicar cómo hemos aleatorizado (tipo de software empleado, tablas de números aleatorios, permutas, etc.). Con el muestreo aleatorio evitamos el sesgo por asignación, permitiéndonos aplicar la teoría de la probabilidad y la inferencia estadística.

### Tipos de diseño experimental

El tipo de diseño experimental determina la asignación de las unidades experimentales a los tratamientos. Aunque los experimentos difieren unos de otros en muchos aspectos, existen diseños estándar que se utilizan frecuentemente. Algunos de los más utilizados, y que se comentan a continuación, son el diseño completamente aleatorizado, diseño por bloques (con un factor bloque), diseños con dos o más factores bloque, y diseños factoriales.

1. Diseño completamente aleatorizado: es el diseño más simple, el análisis estadístico es muy intuitivo (“t” de Student), y se ve poco afectado por tamaños muestrales desiguales. El experimentador asigna los tratamientos a las unidades experimentales al azar. La única restricción es el número de observaciones que se toman en cada tratamiento. Factores como dieta, sexo, y edad se mantienen constantes para todas las observaciones. La principal desventaja de este diseño es que el experimento puede usar demasiados animales, con el peligro de

la falta de homogeneidad y que las condiciones experimentales no sean idénticas para todos (por ejemplo, en tiempo y espacio). Esto conlleva un incremento de la variabilidad y un descenso en la precisión. La consecuencia es que algunos efectos biológicos pueden pasar desapercibidos (falta de poder estadístico), o que haya que incrementar mucho el tamaño muestral para llegar a la precisión deseada. Al variar sólo un factor, perdemos información sobre el efecto de los tratamientos en relación a factores como sexo, cepa, dieta, etc.

2. Diseño en bloques: el diseño en bloques propone dividir la población en segmentos homogéneos (bloques), a continuación se distribuyen los tratamientos, asignando al azar las unidades experimentales a los tratamientos, dentro de cada bloque. Por ejemplo, supongamos que queremos valorar el efecto de un fármaco antihipertensivo (que denominaremos “Y”) en ratas genéticamente hipertensas, conociendo que hay diferencias notables en la medida de la presión arterial por la mañana respecto a la tarde. Dividiremos la población en dos bloques (matinal y tarde), y asignaremos al azar los tratamientos (control o tratamiento Y) a las unidades experimentales (rata) dentro de cada bloque.

Los diseños “randomizados” en bloques son eficaces para controlar la variación debida a efectos aleatorios si se emplea material uniforme y se controla las variaciones en tiempo y lugar (Festing, 2003).

El diseño en bloques más simple es el denominado diseño en bloques completos, en el que cada tratamiento se observa el mismo número de veces en cada bloque. El diseño en bloques completos con una única observación por cada tratamiento se denomina diseño en bloques completamente aleatorizado o, simplemente, diseño en bloques aleatorizado.

Cuando el tamaño del bloque es inferior al número de tratamientos, no es posible observar la totalidad de tratamientos en cada bloque y se habla entonces de diseño en bloques incompletos.

Es frecuente encontrar diseños en los que un bloque está dividido en niveles distintos (por ejemplo, el tratamiento Y a distintas dosis). En este caso, el diseño puede recibir el nombre de diseño con factores bloque anidados, o jerarquizados, o estratificados.

En ocasiones hay dos o más fuentes de variación lo suficientemente importantes como para ser designadas factores de bloque. En tales casos, se denominan diseños en dos o más bloques. En el supuesto de que cada unidad experimental pueda estar sujeta a distintos bloques, entonces tenemos un diseño con factores bloque cruzados. En este diseño, las unidades experimentales reciben todos los posibles niveles de los factores bloque.

Este tipo de diseño permite analizar los resultados mediante métodos estadísticos paramétricos como el análisis de la varianza (ANOVA) y no paramétricos (tests de Mann-Whitney), contrarrestando el abuso de la aplicación de la “t” de Student que se observa en numerosas publicaciones y estudios (Festing y Altman, 2002).

3. Experimentos factoriales: cuando hay muchos factores que pueden influir en la variable de interés, el empleo de experimentos completos tiene el gran inconveniente de necesitar de un número elevado de observaciones, además de ser ineficaz ya que, por lo general, muchos de los factores en estudio puede que no influyan generando mucha información irrelevante. Los diseños factoriales 2k son diseños en los que se trabaja con k factores, todos ellos con dos niveles. Estos diseños son adecuados para tratar el tipo de problemas descritos, porque permiten trabajar con un número elevado de factores.

Los factores son variables independientes que controla el experimentador. La variación debida a efectos fijos como cepa, especie o género, pueden manejarse bien mediante este tipo de diseño factorial. Estas características hacen que los diseños factoriales sean la herramienta más potente para realizar pequeños experimentos para cada factor de forma simultánea, permitiendo el análisis de la interacción entre dichos factores. La principal ventaja es la gran eficacia del diseño, ya que pueden realizarse simultáneamente muchos experimentos, pero si no está balanceado (grupos desiguales, incremento de los valores perdidos...), el análisis estadístico puede ser muy complejo.

### **Tamaño muestral**

Para realizar el cálculo del tamaño muestral, precisamos lo siguiente:

1. Conocer la variación de la medida experimental (ruido experimental).

2. Establecer la magnitud de la diferencia que queremos detectar.
3. Establecer los riesgos  $\alpha$  y  $\beta$ .
4. Definir el tipo de hipótesis a contrastar y su dirección (unilateral o bilateral).
5. Calcular el tamaño de la muestra.

El investigador determina el tamaño muestral teniendo en cuenta la significancia biológica/clínica y la significación estadística. La significancia biológica/clínica es la verificación de que las diferencias encontradas tienen relevancia biológica; la significación estadística es la demostración, mediante el uso de técnicas estadísticas, de que estas diferencias se deben a efectos biológicos y no al azar con un cierto nivel de confianza.

El problema es decidir el tamaño de la diferencia respecto al control y si éste será de interés farmacológico y/o clínico. Aquí, la estadística tiene muy poco que ofrecer, ya que un resultado puede ser estadísticamente significativo y a la vez biológicamente poco relevante. Es el investigador quien tiene que decidir qué diferencia quiere detectar en el experimento.

Para determinar esta diferencia biológicamente relevante debemos de conocer muy bien las condiciones basales de nuestro sistema experimental (ruido experimental). Para obtener un resultado significativo ( $p < 0,05$ , equivalente a un valor de “t” de Student alto), es necesario tener una relación señal/ruido alta:

$$t = \frac{M1 - M2}{\sqrt{2S^2 / n}}$$

Donde “M1-M2” es la señal a detectar (diferencia entre el control el tratamiento), y el denominador es el ruido experimental (“S” es la desviación estándar intragrupo, y “n” el tamaño muestral en cada grupo; Festing, 1992). Un efecto biológico con una relación señal/ruido alta significa una “t” y una precisión altas.

Así, para incrementar “t”, o incrementamos la señal, o reducimos el ruido experimental. Para incrementar la señal podemos, por ejemplo, incrementar la dosis, usar un material más sensible, etc.; y para reducir el ruido podemos emplear un material más homogéneo o incrementar el tamaño muestral (experimentos con muchos animales pueden detectar diferencias o efectos biológicos muy pequeños).

El investigador tiene que decidir que niveles de riesgo (riesgo  $\alpha$  y  $\beta$ ) aceptará en el experimento. Aceptar un riesgo  $\alpha$  del 0,05 quiere decir que damos una probabilidad del 5% para que la diferencia a detectar sea debida al azar. Cometemos un error  $\alpha$  (o error tipo I), cuando afirmamos que dos tratamientos son distintos cuando en realidad son iguales (falsos positivos). Aceptar un riesgo  $\beta$  del 20% significa que si la diferencia que buscamos realmente existe, el experimento tiene una probabilidad del 80% de detectarla (poder estadístico). Producimos un error  $\beta$  (tipo II) cuando llegamos a la conclusión de que dos tratamientos son iguales cuando en realidad son diferentes (falsos negativos).

Otro aspecto que debe definir el investigador es la hipótesis experimental de contraste, y la dirección en que va a realizar el análisis estadístico. La hipótesis se define como hipótesis nula ( $H_0$ ) cuando no esperamos que haya diferencias entre un grupo tratado respecto a uno control; e hipótesis alternativa ( $H_1$ ) cuando sí las esperamos. El investigador debe decidir cómo realizará el análisis estadístico: la dirección puede ser unilateral o bilateral. Cuando la hipótesis del investigador tiene una dirección (por ejemplo: el alcohol disminuye el tiempo de reacción ante un obstáculo), nos hallamos ante una hipótesis unilateral. En cambio, cuando no nos interesa la dirección de la hipótesis experimental (por ejemplo, el alcohol modifica el tiempo de reacción ante un obstáculo) la hipótesis es bilateral (sólo queremos testar si hay modificación, y no nos interesa si ésta incrementa o disminuye respecto al grupo control).

En los apéndices I y II respectivamente, los lectores hallarán la forma de calcular manualmente el tamaño muestral para comparar proporciones y medias de dos muestras independientes (Dell et al., 2002). En las siguientes direcciones de Internet, se destacan una serie de herramientas estadísticas de utilidad para el cálculo del tamaño muestral:

- <http://www.biomath.info/power/index.htm>
- <http://en.freestatistics.info/stat.php>  
 MOREPOWER (4.0) (power & sample size calculator)  
 PS (2.1) (power & sample size calculation)
- <http://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/n2.html>

## OTRAS CONSIDERACIONES GENERALES

Los experimentos suelen ser estudios controlados confirmatorios o exploratorios (ambos generadores de hipótesis), aunque hay experimentos en los cuales no se pretende hacer ningún contraste de hipótesis, por lo que el cálculo de tamaño muestral no será necesario, y la justificación del número de animales se basará en otros aspectos. Como ejemplo, podemos citar los estudios de toxicocinética en los que se obtienen resultados descriptivos de los parámetros farmacocinéticos, que pueden compararse estadísticamente por género, dosis y día de tratamiento, pero sin la necesidad de establecer una hipótesis experimental previa para buscar diferencias.

Los experimentos hay que planificarlos antes de realizarlos, incluyendo el diseño y los métodos estadísticos que van a emplearse para tratar los resultados. En los estudios exploratorios (o ensayos piloto), puede ser útil mostrar un menor énfasis en el contraste de hipótesis. A veces, es conveniente solapar estudios exploratorios y confirmatorios, pero esto debe quedar muy claro en el procedimiento. No está de más subrayar que los estudios exploratorios permiten encontrar información útil para la mejor planificación de un estudio más definitivo o confirmatorio. Pero los resultados obtenidos con pocos animales pueden ser muy imprecisos, por lo

que hay que ser cauto en emplear estos datos para calcular el tamaño muestral para posteriores estudios confirmatorios.

Finalmente, hay que resaltar que un buen diseño experimental debe incluir un apartado en el que el investigador debe declarar que tipo de análisis estadístico va a realizar con los resultados obtenidos. La idoneidad de los métodos estadísticos es dependiente del tipo de diseño empleado, de forma que un procedimiento experimental no debería nunca de empezar sin tener claro como van a analizarse los resultados.

## CONCLUSIONES

El uso de animales de experimentación genera importantes cuestiones de tipo ético. Los animales sólo deben usarse si los objetivos van a ser válidos, no existe alternativa a su uso, y si los recursos empleados son éticamente aceptables. La validez en este caso implica que el experimento tenga una probabilidad alta de alcanzar los objetivos propuestos, y que éstos contribuyan positivamente a la salud de humanos y/o animales.

Ignorar los principios básicos del diseño experimental y/o analizar de forma incorrecta los resultados es una pérdida de recursos de difícil justificación ética.

### ASPECTOS QUE DEBE INCLUIR UN PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

- Antecedentes y objetivos
- Sustancias de referencia y/o de control
- Definición de la unidad experimental
  - Definición del diseño experimental empleado
    - o Diseño
      - completamente aleatorizado
      - bloques /estratificación
      - factorial.
    - o Número de replicados
    - o Aleatorización
    - o Tamaño muestral
    - o Análisis estadístico

Tabla 1.

Aspectos fundamentales en el diseño de un procedimiento experimental.

El empleo de diseño aleatorizado por bloques y la asignación factorial de tratamientos, incrementa de forma sustancial la eficacia de los experimentos en animales, proporcionando un mejor control de la variación y de la aplicación del análisis estadístico.

### BIBLIOGRAFÍA

- FESTING MFW. *Reduction of animal use: experimental design and quality of experiments*. *Laboratory Animals* 1994; 28: 212-221.
- FESTING MFW ALTMAN DG. *Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals* *ILAR Journal* 2002; 43: 244-258.
- Directiva del Consejo 86/609/EEC Artículo 7(3) de 24 de noviembre de 1986 relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias, y administrativas de los Estados miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (86/609/CEE).
- DELL RB, OYERAN S, RAMAKRISHNAN R. *Sample size determination*. *ILAR Journal* 2002; 43: 207-213.
- FESTING MFW. *The scope for improving the design of laboratory animal experiments*. *Laboratory Animals* 1992; 26: 256-267.
- FESTING MFW. *Principles: The need for better experimental design* *Trend in Pharmacological Sciences* 2003; 24: 341-345.
- FESTING MFW, OVEREND P, DAS RG, et al. *The design of animal experiments. Reducing the use of animals in research through better experimental design*. *Laboratory Animals Handbooks* nº 14. 2002: 39.

### APÉNDICE I

Cálculo del tamaño muestral para la comparación de proporciones de dos muestras independientes.

$$N = C \times \frac{Pc \times (1 - Pc) + Pe \times (1 - Pe)}{d^2} + \frac{2}{d} + 2$$

Pc: proporción observada de respuestas en el grupo control

Pe: proporción observada de respuestas en el grupo experimental

$d = |Pc - Pe|$  es la diferencia entre ambas proporciones

C: constante que depende de los riesgos  $\alpha$  y  $\beta$  escogidos:

$\beta$	$\alpha$	
	0.05	0.01
0.2	7.85	11.68
0.1	10.51	14.88

*Ejemplo:* si la proporción observada en el grupo control es del 80% y el investigador quiere detectar una proporción del 20% en el grupo experimental ( $d=60\%$ ), con unos errores  $\alpha$  y  $\beta$  del 5% y del 20% respectivamente ( $C=7.85$ ), el tamaño de la muestra es:

$$N = 7.85 \times \frac{(0.8 \times 0.2) + (0.2 \times 0.8)}{0.6^2} + \frac{2}{0.6} + 2 = 12.30$$

El experimento se realizará con 13 animales por grupo.

## APÉNDICE 2

Cálculo del tamaño muestral para la comparación de medias de dos muestras independientes

Una vez estimada la desviación estándar (SD) de la variable de interés y establecida la magnitud que deseamos detectar (d), el tamaño muestral (N) puede establecerse mediante la relación entre SD, d y Z:

$$N = 1 + 2 \times Z \times \left( \frac{SD}{d} \right)^2$$

	$Z_{unilateral}$	$(Z_{\alpha} + Z_{\beta})$	$Z_{bilateral}$	$(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})$
Riesgo $\beta$	$\alpha=0.01$	$\alpha=0.05$	$\alpha=0.01$	$\alpha=0.05$
0.05	15.7704	10.8222	17.8142	12.9947
0.10	13.0169	8.5638	14.8794	10.5074
0.15	11.3083	7.1893	13.0484	8.9784
0.20	10.0360	6.1826	11.6790	7.8489

*Ejemplo:* la desviación estándar de la variable cuantitativa de interés es de 8 y la diferencia que el investigador quiere detectar entre la media del grupo control y la del grupo experimental de 10. Considerando un error  $\alpha$  y  $\beta$  del 5% y del 20%, respectivamente, y utilizando una hipótesis bilateral, el tamaño muestral será de:

$$N = 1 + 2 \times 7.8489 \times \left( \frac{8}{10} \right)^2 = 11.04$$

Tomaremos 11 animales por grupo. Imaginemos que hemos previsto una pérdida del 10%, entonces el tamaño muestral ajustado será de:

$$N_a = N \times \frac{1}{1 - R} = 11 \times \frac{1}{1 - 0.1} = 12.2$$

Utilizaremos 13 animales por grupo, donde  $N_a$  es el tamaño muestral ajustado, N el tamaño muestral calculado sin el ajuste y R el porcentaje estimado de pérdidas en el experimento.

# 5 ¿Y tú qué OPINAS?

EN ESTA SECCIÓN DESCRIBIMOS CASOS CLÍNICOS O PRÁCTICOS  
“INTERACTUANDO” CON EL LECTOR.

TODOS LOS SOCIOS ESTÁN INVITADOS A PARTICIPAR APORTANDO SUS CASOS

CONTACTO: JOSÉ LUIS MARTÍN BARRASA; [jlbarrasa@terra.es](mailto:jlbarrasa@terra.es)

## CASO 1

### ALOPECIA FACIAL EN RATONES

*Miguel Ángel Silva Díaz*

*Unidad de Investigación*

*Hospital Universitario de Gran Canaria, Dr. Negrín*

El personal que trabaja en un animalario, se encuentra haciendo el cambio de cubetas en una de las salas. El cuidador observa que de los 7 ratones Swiss, machos, que se encuentran en una cubeta de policarbonato de 290 cm<sup>2</sup>, todos, excepto uno, presentan una marcada zona de alopecia que afecta a las periferias del hocico, incluso con ausencia de vibrissas (Figs. 1 y 2). Estos animales tienen un peso de 35 g y se encuentran en régimen de reserva, preparados

para entregárselos al investigador en el plazo de quince días.

Se realizaron raspados cutáneos procesados con hidróxido potásico, se tomaron muestras de pelo y se procedió a un hisopado de la zona afectada de piel. Tras enviar las muestras al laboratorio de microbiología no se evidenció la presencia de dermatofitos, ácaros u otros agentes patógenos, que pudieran explicar estos hallazgos clínicos.



Figura 1.  
Alopecia circunscrita a la zona del hocico



Figura 2.  
Detalle. Obsérvese la ausencia de vibrissas.



### ¿Y TÚ QUÉ OPINAS?:

1. ¿A qué crees que es debido?
2. ¿Qué medidas podríamos tomar para solucionar el problema?



### SOLUCIÓN:

Ante la ausencia de hallazgos microbiológicos que expliquen una etiología fúngica, bacteriana o parasitaria, debemos buscar la causa en un posible problema de manejo.

El marcado carácter territorial de estos animales, sumado a la agresividad propia de la especie, hace que las luchas entre individuos sean un problema frecuente, si no se respetan las recomendaciones establecidas al efecto (Jennings et al., 1998; Recomendaciones de la Comisión de 18 de junio de 2007). Este tipo de lesiones en el hocico, con desaparición total o parcial de las vibrisas, es un signo de dominancia, cuando uno de los ratones lame, masca la piel y las vibrisas de otros ratones sumisos.

En este caso concreto, nos orienta bastante en el diagnóstico, el saber que sólo 1 de los 7 ratones no presenta lesiones (probablemente el animal dominante).

La legislación recomienda una superficie de 100 cm<sup>2</sup>/ratón de un peso de 35 grs. y, evidentemente, en nuestro caso la superficie es mucho menor a la recomendada para ese número de animales y peso (3500 cm<sup>2</sup>). En términos de bienestar, la cantidad de espacio es un parámetro importante, ya que, dicta el tamaño posible del grupo, la posibilidad de desarrollar comportamientos relacionados con la locomoción o exploración y la presencia, o no, de conductas aberrantes. Por tanto, los criterios para determinar los requerimientos de espacio no deben venir determinados exclusivamente por el peso del animal: la cepa, el tamaño del grupo, la edad, el estatus reproductivo, las actividades que se están realizando, son también aspectos fundamentales que se deben contemplar.

Los comportamientos del ratón se realizan en las tres dimensiones, por lo tanto, el volumen de la cubeta es otra dimensión condicionante.

Dentro de las medidas que deberíamos contemplar para corregir y prevenir estos problemas, destacarían los siguientes:

- 1.- Aumentar el tamaño de las cubetas, siempre que sea posible, ya que las medidas que aparecen en las guías son las mínimas recomendadas. Tampoco interesa aumentar demasiado la superficie, sin incorporar elementos de enriquecimiento ambiental, ya que los espacios demasiado grandes y vacíos favorecen las agresiones entre machos por delimitar el territorio.
- 2.- Aumentar la altura de la jaula, pero permitiendo que el animal pueda trepar hasta la rejilla, ya que a los ratones les gusta colgarse de las barras. Una opción barata podría ser utilizar jaulas de ratas e incorporar bloques grandes de “legos”, cajas de puntas de pipetas, trozos de tubería, contenedores vacíos de agujas, en definitiva, material de fácil limpieza y del que se pueda disponer sin problemas en nuestro entorno.
- 3.- Limpiar lo más eficazmente posible la jaula, una vez a la semana. De este modo garantizamos la buena higiene y salud de nuestra colonia sin perturbar demasiado las marcas olorosas que determinan las respuestas sociales entre individuos. Eliminar estas marcas de territorialidad de las jaulas, con frecuentes lavados de las cubetas, supone eliminar los signos utilizados para el reconocimiento de los distintos miembros del grupo y se agudizarían las respuestas agresivas. A tal efecto, se podría solucionar este problema añadiendo un poco de lecho sucio en la jaula limpia.
- 4.- Vigilar siempre a los animales después del cambio y limpieza de la cubeta.

5.- Siempre que sea posible, debemos formar los grupos de una misma cubeta con animales jóvenes, recién destetados para evitar las luchas y agresiones típicas de adultos.

## BIBLIOGRAFÍA

M. JENNINGS, G.R. BATCHELOR, P.F. BRAIN, *et al.* *Refining rodent husbandry: the Mouse Report of the Rodent Refinement Working Party.* Lab. Anim. 1998; 32: 364-368.

KALUEFF AV, MINASYAN A, KEISALA T, *et al* *Hair barbering in mice: Implications for neurobehavioural research.* Behav. Processes 2006; 71:8-15.

Recomendaciones de la Comisión de 18 de junio de 2007 sobre las líneas directrices relativas al alojamiento y al cuidado de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos [notificada con el número C(2007) 2525](Texto pertinente a efectos del EEE :2007/526/CE).

## CASO 2

### MODELO DE XENOINJERTO TUMORAL

*Isabel Blanco Gutiérrez*

*Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid*

Un investigador está interesado en la realización de un modelo de xenoinjerto en ratones inmunodeprimidos, para comprobar la implicación de un gen en la progresión y crecimiento del foco tumoral primario y en el desarrollo de metástasis pulmonares.

La línea celular procede de otro centro de investigación y no ha sido chequeada con anterioridad frente a patógenos murinos.

El crecimiento in vitro de la línea celular es muy rápido y quisieran empezar con el ensayo cuanto antes.

Los animales serán inoculados por vía subcutánea, se medirá el tamaño del nódulo con un calibre dos veces por semana, hasta un determinado tamaño en que se hará la resección del foco primario. El seguimiento de la metástasis se realizará mediante imagen molecular (PET-CT) hasta la aplicación del criterio del punto final.



### ¿Y TÚ QUÉ OPINAS?:

1. ¿Qué primeras medidas tienes que tener en cuenta?
2. ¿Qué cepa inmunodeprimida de ratón aconsejarías?
3. ¿En que momento realizarías la exéresis tumoral?



## SOLUCIÓN:

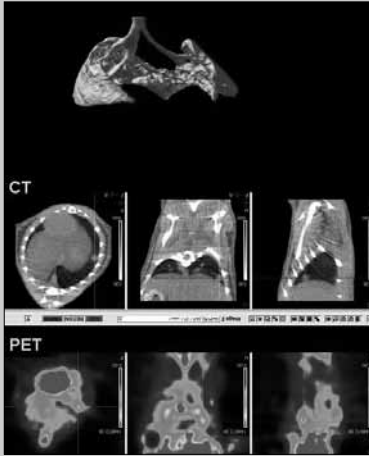


Figura 1.  
Imagen obtenida mediante PET-TC  
de un ratón inoculado con células tumorales.  
(Cedida por la Dra. Francisca Mulero;  
Unidad de Imagen Molecular).

Una vez que el procedimiento ha sido aprobado por el CEEA del Centro, se ha de testar la línea celular por PCR, en lo que respecta a patógenos murinos, cuyos resultados tardan aproximadamente dos semanas. De esta manera podemos evitarnos muchos problemas innecesarios. Se descarta realizar un MAP (“Monoclonal Antibodies Production”), porque se requiere mucho más tiempo.

Respecto a la cepa de elección, nos decidimos por ratones SCID porque en los ratones Nude el crecimiento del tumor es local, encapsulado, y sólo en raras ocasiones se han observado metástasis. Sin embargo, en el ratón SCID el tumor es más invasivo y pueden encontrarse metástasis con mayor frecuencia (Xie et al., 1992). La cepa consanguínea BALB/c-Nude tiene resultados similares a los SCID, pero sabemos que es un grupo de investigación pequeño y los ratones BALB/c-Nude son más caros, por lo que decidimos trabajar con ratones de la cepa SCID de 7 semanas de edad.

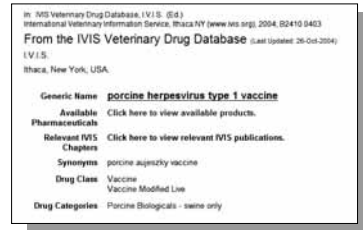
La resección del foco primario, utilizando isofluorano al 2% y buprenorfina al 0,1 mg/ml, se realiza cuando el diámetro medio del nódulo sea de 17 mm, y sin sobrepasar este punto para evitar dolor y sufrimiento a los animales (United Kingdom Co-ordinating Committee on Cancer Research –UKCCCR- Guidelines for the Welfare of Animals in Experimental Neoplasia). A los animales se les sigue observando y chequeando por PET-CT una vez por semana, hasta la aplicación del criterio de punto final donde tendremos en cuenta sobre todo síntomas respiratorios y de aspecto general del animal. Las imágenes nos darán información sobre el momento idóneo para el sacrificio, sobre todo si la diferencia en el crecimiento y desarrollo de la metástasis entre los dos grupos es muy grande, evitando así el sufrimiento innecesario del animal.

## BIBLIOGRAFÍA

XIE X, BRÜNNER N, JENSEN G, ET AL. *Comparative studies between NUDE and SCID mice on the growth and metastatic behavior of xenografted human tumors.* Clin. Exp. Metastasis 1992; 10: 201-210.

UNITED KINGDOM CO-ORDINATING COMMITTEE ON CANCER RESEARCH (UKCCCR) *Guidelines for the Welfare of Animals in Experimental Neoplasia (Second Edition).* Br. J. Cancer 1998; 77: 1-10.

# 6 Páginas WEB



## GENÓMICA Y MODELOS MURINOS

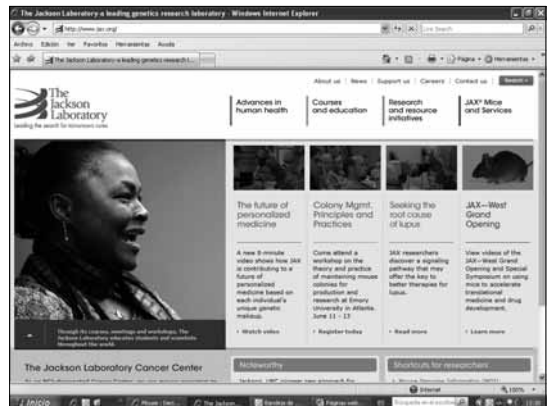
*Lluís Montoliu*

*Centro Nacional de Biotecnología (CNB) - CSIC, Madrid*

La I Jornada Científica organizada por el Comité Español ICLAS y celebrada en Madrid, en el CNIC, el día 11 de marzo de 2009, permitió disfrutar de una serie de conferencias informativas, interesantes todas, relativas a diversos temas de experimentación animal. En particular una de las exposiciones que aportaron un mayor número de herramientas bioinformáticas, para el aprovechamiento adecuado de toda la ingente cantidad de información disponible en Internet, fue la charla que impartió Susan M. Bello (Mouse Genome Informatics, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA). A partir de sus sugerencias, y completándolas con otras que considero igualmente interesantes, he preparado este compendio de páginas web de visita recomendada, para su utilización como fuentes de información actualizada de cepas, genes, mutantes y proyectos internacionales en los que aparece la experimentación animal.

Lo primero que es necesario indicar es que en Internet la mayoría de las páginas WEB que mencionaré a continuación están profusamente interconectadas. De ahí que no sea importante aprenderse las todas o saber de todas ellas; sabiendo solamente de algunos portales singulares es posible navegar hacia las demás. Uno de estos portales singulares es, sin duda, la web de "The Jackson Laboratory" (<http://www.jax.org>). Como proveedor mundial de muchas cepas de ratón y modelos animales lo primero que uno encuentra son unos motores de búsqueda muy sencillos, pero potentes, que permiten

determinar si tienen o no la cepa que buscamos (<http://jaxmice.jax.org/findmice/>). Tampoco es nada desdeñable su sección dedicada a material de soporte, informativo, pósters, protocolos, etc. (<http://jaxmice.jax.org/support/>), además de todo el programa de cursos, talleres y congresos que organizan periódicamente sobre diversos temas (<http://www.jax.org/courseseducation/>).



Sin embargo, la sección estrella de la página web de "The Jackson Laboratory" tiene personalidad propia, y la conocemos como "Mouse Genome Informatics", o también conocida como MGI (<http://www.informatics.jax.org/>). Este es el verdadero repositorio mundial que contiene la información conocida de cepas de ratón, genes, genoma, sistemas de genotipaje, patología, modelos

animales, fenotipos, bancos de embriones, material adicional, etc.

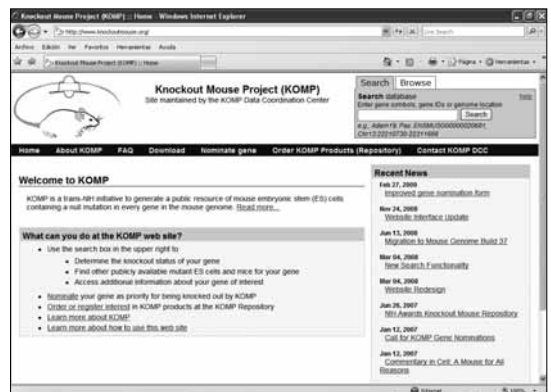
El portal MGI está dividido en 8 secciones: GENES, PHENOTYPES, EXPRESSION, FUNCTION, PATHWAYS, STRAINS/SNPS, ORTHOLOGY Y TUMOURS, por supuesto totalmente interconectadas. Una de las más utilizadas es GENES (<http://www.informatics.jax.org/genes.shtml>), pues permite recabar todo lo que se conoce de un gen determinado con el que estemos trabajando. Los datos que se ofrecen asociados a un gen incluyen -además del nombre, posición en el genoma, sinónimos, mutación asociada, etc.-, el mapa genético, la secuencia primaria de ADN (con interconexiones directas a las bases de datos genómicas de ENSEMBL: <http://www.ensembl.org>, NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, o UCSC: <http://genome.ucsc.edu>), la descripción de todos los alelos mutantes conocidos (espontáneos, inducidos, transgénicos, knock-outs), datos del perfil de expresión génica y de los reactivos recomendables para genotipar, polimorfismos conocidos e innumerables interconexiones adicionales con bases de datos externas con información complementaria.



Otra sección igualmente útil es la que contiene información genética sobre las cepas de ratón y los polimorfismos (SNPs) que las caracterizan: STRAINS/SNPS ([http://www.informatics.jax.org/strains\\_SNPs.shtml](http://www.informatics.jax.org/strains_SNPs.shtml)). En esta sección, además, se encuentran las recomendaciones para nombrar adecuadamente cualquier cepa de ratón que necesitemos describir (<http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/strains.shtml>), y el repositorio general de cepas de ratones, el IMSR ("International Mouse Strain Resource": [\[dex.jsp\]\(#\)\), que permite localizar cualquier cepa de ratón, sea en forma de individuos vivos o embriones/esperma congelado, en cualquiera de los múltiples repositorios internacionales existentes.](http://www.findmice.org/in-</a></p>
</div>
<div data-bbox=)

Finalmente, es importante comentar la sección sobre recursos adicionales, RESOURCES (<http://www.informatics.jax.org/resources.shtml>), a través de la cual se puede acceder a herramientas interesantes y, especialmente, a un buen número de libros clave en genética y experimentación con el ratón.

Desde las páginas web de Jackson puede accederse virtualmente a cualquier otra página relacionada con la genética o la experimentación del ratón. Entre ellas, puede accederse también a un grupo de proyectos internacionales en colaboración que representan la frontera actual en genómica funcional del ratón. Son los proyectos encaminados a obtener ratones mutantes representativos de todos y cada uno de los más de 20.000 genes que tiene el genoma del ratón (y nuestro genoma). Existen tres iniciativas principales, el proyecto "Knock-Out Mouse Project", o también KOMP (<http://www.knockoutmouse.org/>), liderado por el NIH en EE.UU., que actúa también de coordinador de los demás; el proyecto europeo EUCOMM (<http://www.eucomm.org>); y el proyecto norteamericano, coordinado desde Canadá, denominado NORCOMM (<http://www.norcomm.org>). Cada uno de ellos usa vectores ligeramente distintos para generar los ratones mutantes, bien sea por integración al azar, o bien de forma dirigida, con peculiaridades técnicas distintas, centrandos los esfuerzos en generar alelos nulos, o alelos que puedan usarse posteriormente para la generación de ratones mutantes condicionales en espacio y tiempo. Actualmente, la visita a la página KOMP es obligada para todo aquel laboratorio que se plantee la generación de un nuevo ratón mutante.



La consulta de las bases de datos interconectadas de estos proyectos internacionales, ofrecerá datos actualizados sobre si ya existe y está disponible el ratón mutante que deseamos generar, pudiéndonos ahorrar un gran trabajo. Igualmente, puede inducirse el interés en la generación de un determinado nuevo mutante (puede “nominarse”), si se documenta su necesidad experimental. Si los razonamientos son atendidos, se cambiará la prioridad y el orden de esa mutación que pasará a realizarse de inmediato.

A estos tres grandes proyectos internacionales se les ha unido la iniciativa del “Texas A&M Institute for Genomic Medicine” (TIGM), quienes, a través de bibliotecas de clones de células ES (del inglés, embryonic stem cells) adicionales, también participan en la obtención de ratones mutantes representativos de todos los genes del ratón (<http://www.tigm.org>). Los activos de TIGM incluyen la colección privada de clones ES con mutaciones en multitud de genes, provenientes de la empresa “Lexicon Genetics”.



# 7 SEGURIDAD 5 en 5 minutos

*Os presentamos una nueva sección, en la que pretendemos comentar de forma breve y aplicativa los principales temas relacionados con la Prevención de Riesgos Laborales en nuestro sector.*

*Para elaborar futuros temas contamos con vuestra participación. En este sentido hemos publicado en la página web de SECAL una encuesta sobre satisfacción en el trabajo, para conocer, evaluar e intentar mejorar las condiciones de trabajo en nuestro contexto profesional.*

*Os animamos a rellenarla y hacérsosla llegar (jesus.martinez@ciemat.es; CIEMAT – Servicio de Animalario – Avenida Complutense 22 Edificio 7 – 28040 Madrid; FAX 91 3466484)*

*Muchas gracias y esperamos que esta contribución sea de vuestro agrado.*

*Ricardo Vera Rodríguez – Jesús Martínez Palacio  
Técnicos Superiores en Prevención de Riesgos Laborales  
Responsables de la Sección*

## CAÍDAS AL MISMO NIVEL

**Jesús Martínez Palacio**

*Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), Madrid*

Uno de los riesgos más comunes (y menos considerados) en nuestras instalaciones son las caídas al mismo nivel. Es un accidente de probabilidad media, ligeramente dañino, y que suele considerarse un riesgo trivial o tolerable.

En la estadística de nuestro Centro, representa un 15% de los accidentes y es de los pocos que han cursado con bajas laborales del personal.

### ¿POR QUÉ OCURREN ESTOS ACCIDENTES?

Normalmente nos desplazamos por superficies con buenas condiciones, pero es habitual la presencia de elementos que pueden originar tropiezos o caídas (mobiliario, materiales, cubetas, etc.), o su-

perficies mojadas deslizantes (biberones, limpiezas y desinfección de suelos, zonas de lavado).

También es común trabajar con baja iluminación (pasillos y salas de animales albinos), incluso en condiciones de 'luz roja' en salas fuera del ciclo de luz.



*Señal de suelo mojado*

## COMO DEBEMOS ACTUAR PARA EVITARLAS

- Sería conveniente establecer programas periódicos de ‘orden y limpieza’, para ubicar adecuadamente los elementos que puedan originar caídas.
- Debemos evitar dejar materiales en pasillos y zonas de paso (hay un Real Decreto, el 486/1997, relativo a espacios y vías de circulación).
- Hay que evitar el uso de acabados deslizantes en los suelos (limpios sí, pero no deslizantes), así como recoger los vertidos de líquidos en cuanto sea posible.

- Avisar con carteles si los suelos están mojados.
- El calzado debe ser cómodo, bien sujeto, con talón cerrado y, si es posible, con suela antideslizante (hay que abandonar los zuecos tradicionales).
- En cualquiera de las circunstancias descritas arriba, debemos extremar las precauciones en los desplazamientos.

### TIPOS DE ZAPATOS PROFESIONALES



**Bota impermeable y esterilizable**



**Zueco tradicional**



**Zueco con sujeción al talón, más recomendable**



**Zapatos cerrados, el ideal**



**Suelas antideslizantes**

# 8 ENTREVISTAS

PERFILES RELACIONADOS CON LA CIENCIA  
DEL ANIMAL DE LABORATORIO



## LUIS MUÑOZ DE LA PASCUA

Lugar de Trabajo:

Universidad de Salamanca

Breve descripción del cargo que ocupa:

Director del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca

Años Experiencia:

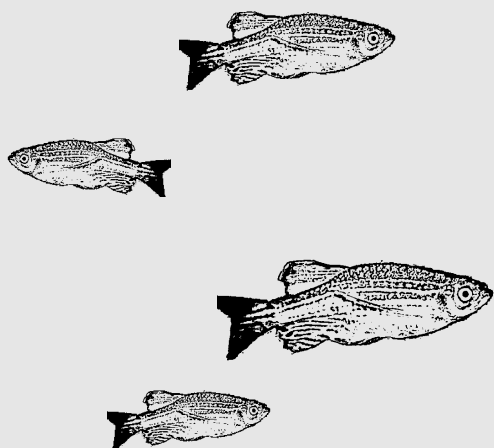
18 años.

Sociedades en las que participa:

SECAL y ESLAV.

Participación dentro de SECAL:

He sido miembro de la Junta de Gobierno y colaborador de la revista de la SECAL.



**¿Cómo se inició en el campo de la ciencia del animal de laboratorio?**

Mi primer contacto con este mundo fue la realización de un curso de capacitación para el uso de animales de laboratorio, en la Universidad Autónoma de Barcelona. En éste, conocí a mi amigo Fernando Núñez y, gracias a su mediación, tuve la oportunidad de realizar una estancia en Madrid donde, tanto él como Carmina Fernández Criado, me abrieron las puertas de sus respectivos centros para aprender de su experiencia, y también de su calidad humana. Pasé unos meses fundamentales para mi aprendizaje en Ciencias del Animal de Laboratorio, y mi posterior desarrollo como profesional del sector.

Posteriormente, y gracias a Carmina, conocí a Javier Palacín, del Centro de Biología Molecular, gran profesional y mejor persona, quien generosamente me acogió en su animalario, donde también aprendí numerosas técnicas experimentales y tuve la oportunidad de tener mi primer trabajo remunerado en animalarios, al ser contratado como cuidador durante el período estival.

Por último, también pasé una temporada en el Hospital Ramón y Cajal, con Carlos Correa y Pablo Jorge Herrero, conociendo el trabajo de investigación con animales en el entorno hospitalario, muy diferente del de los animalarios tradicionales, y del que tengo también muy gratos recuerdos.

**Resumen de su actividad profesional**

Mi actividad profesional, exceptuando un par de años en las campañas de saneamiento ganadero como veterinario autónomo, se ha desarrollado íntegramente, y desde que dejé Madrid, en la Universidad de Salamanca (USAL), donde actualmente dirijo el Servicio de Experimentación

Animal. He sido responsable del diseño y puesta en marcha de tres animalarios, que dan servicio a la comunidad investigadora de la Universidad y a los centros mixtos USAL&CSIC, como el Centro de Investigación del Cáncer. Aunque realicé los cursos de doctorado en Córdoba -mi Universidad de origen, realicé mi tesis doctoral en la USAL, dentro del grupo de neurobiología de la audición, y recuperando en este trabajo una línea de hámsteres con epilepsia audiogéna, que estaba a punto de extinguirse. He sido partícipe en la gestación de la unidad de transgénesis de la USAL, y también he colaborado como autor en dos capítulos del libro de "Ciencia y tecnología del animal de laboratorio".

También, y con la co-organización del Instituto de Estudios de Ciencias de la Salud de Castilla y León (IECSCYL) y de Animalaria, organizo desde hace tres años un curso anual de categoría B, acreditado por la Junta de Castilla y León.

En la actualidad, me encuentro inmerso en la ilusionante, y a la vez difícil tarea, de organizar nuestro congreso bianual, del cual espero salir íntegro a su conclusión

**¿Cuáles son los temas que más le interesan relacionados con la ciencia del animal de laboratorio?**

En general me fascina todo lo que tiene que ver con la biotecnología, pero me gustan en particular todos aquellos temas relacionados con las nuevas tecnologías que se emplean para la estabulación y logística en los animalarios, y también los temas de reproducción asistida y de la patología de los animales de laboratorio.

**¿Cuáles son sus objetivos para los próximos años?**

En primer lugar me gustaría que el congreso que se celebrará el próximo noviembre sea un éxito para la SECAL en todos los aspectos, y que todos aquellos que vengan sientan como provechosa su visita. En cuanto a la Universidad, y dados los tiempos que corren, me gustaría poder contar con herramientas eficaces para gestionar y consolidar la plantilla de trabajadores del Servicio y así poder planificar el trabajo de forma eficaz. Pero, sobre todo, lograr ilusionar e ilusionarme en el día

a día con nuevos retos y transmitir a todos los que comienzan a tratar con animales la importancia del correcto manejo de los mismos y la necesidad de implicarse en el bienestar animal para hacer ciencia de calidad.

**¿Que consejos daría a los que ahora se inician?**

En primer lugar les diría que aprovechen el tiempo al máximo, porque pasa muy rápido, y que procuren sacar lo bueno de cada sitio donde estén. Creo que es muy importante también ejercer de cuidador durante un tiempo, para saber el día a día de los animalarios, y poder después aplicar la experiencia a las labores de dirección.

También recomendaría realizar estancias en el extranjero y especializarse, aunque dada la situación en España siempre nos toca hacer un poco de todo.

**¿Qué opinión le merece la oferta de formación presente en España?**

En general la oferta me parece suficiente para la categoría D y escasa para las demás, sobre todo la C. Si actualmente se aplicara la normativa a rajatabla, la mayoría de investigadores noveles, como por ejemplo los "Ramón y Cajal", no podrían ejercer como tales. En el caso de las categorías A y B, la oferta mejora, pero todavía falta mucho por hacer al respecto, aunque creo que lo fundamental sería que los ministerios competentes legislaran claramente respecto al tema de las acreditaciones/formación, y no dependiéramos del criterio de cada comunidad autónoma. Ya hace tiempo que se promulgó el Real Decreto 1201/2005, y va siendo hora de que este asunto termine de aclararse. Creo que es muy importante que los postgraduados que vayan a dedicarse a la investigación con animales cuenten de forma obligatoria, durante el doctorado, al menos con la formación equivalente a experimentadores y se les dé la opción de conseguir la categoría C mediante cursos adicionales que puedan ser cofinanciados por las Universidades.

**Cite dos profesionales a los que sería interesante poder realizar este cuestionario**

José María Orellana  
Fernando Núñez



# ENTREVISTAS

PERFILES RELACIONADOS CON LA CIENCIA  
DEL ANIMAL DE LABORATORIO



## JORDI POLO MARÍN

Lugar de Trabajo:

Harlan Laboratories S.A.

Breve descripción del cargo que ocupa:

Responsable “Unidad de Estabulario”

Años Experiencia:

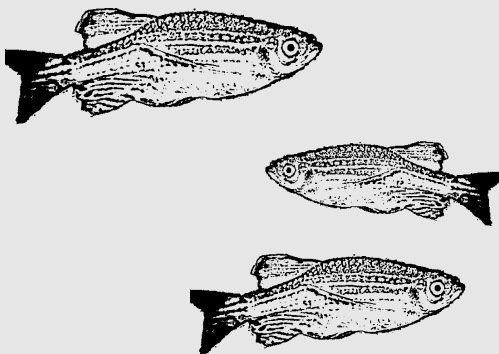
27 años.

Sociedades en las que participa:

SECAL

Participación dentro de SECAL:

Soy miembro de la SECAL desde hace varios años. Asisto, generalmente, a todos los congresos que organiza la SECAL.



### ¿Cómo se inició en el campo de la ciencia del animal de laboratorio?

SEmpecé de muy joven trabajando como ayudante de laboratorio con animales de experimentación. La formación, la experiencia y la participación en procedimientos experimentales, con compañeros de gran nivel, me han ayudado a mejorar en mi puesto de trabajo hasta llegar a ser Responsable de la Unidad de Estabulario.

### Resumen de su actividad profesional

En nuestro Centro somos, aproximadamente, unos 160 trabajadores, de los cuales unos 50 son experimentadores y cuidadores. Una de mis funciones básicas es la organización, control y formación de este personal (disponemos de personal con experiencia para trabajar con varias especies de animales).

Otra de las funciones es coordinar, junto con los directores de estudio, las fechas, procedimientos, y otros aspectos de los estudios, de manera que sea posible realizarlos todos disponiendo de salas para animales, material, personal entrenado, etc. para desarrollarlos con las máximas garantías de calidad.

El control de toda la documentación, como registros de entrenamiento del personal, procedimientos normalizados de trabajo (PNTs), verificación y mantenimiento de equipos, etc., también es una parte importante de mi trabajo.

La coordinación, organización y estructura de la Unidad de Estabulario es una tarea realmente complicada en la que es de gran importancia disponer de personal de buen nivel. Actualmente disponemos de 3 grandes áreas, divididas por anima-

les de diferente especie, y controladas cada una de ellas por técnicos con buena formación y experiencia.

**¿Cuáles son los temas que más le interesan relacionados con la ciencia del animal de laboratorio?**

La formación del personal y el bienestar animal, son dos de los temas que más me preocupan.

Las instalaciones se pueden adaptar a las normativas en cuanto a bienestar animal, pero el personal debe ser consciente de la importancia del trato hacia los animales de laboratorio.

Me interesa mucho estar al día en nuevas técnicas y métodos de trabajo, equipaciones de estabulario, etc. Y, por supuesto, la informática, que bien aplicada a los sistemas de control y organización, ayuda mucho a trabajar de manera lógica y ordenada.

**¿Cuáles son sus objetivos para los próximos años?**

Ahora estamos trabajando en algo muy interesante. Mejorar, en todo lo posible, el equipo de trabajo de la Unidad de Estabulario en nuestra Empresa. Tener un equipo de trabajo responsable a todos los niveles, con gran implicación en el trabajo, y con buen nivel de preparación y capacidad para desarrollar procedimientos experimentales con eficacia.

**¿Que consejos daría a los que ahora se inician?**

Sobre todo para gente que empieza como cuidador de animales de experimentación, intentar implicarse al máximo en el trabajo, ser consciente de la importancia de realizar bien las tareas más básicas, y no dejar de utilizar los medios de que dispongamos para mejorar al máximo la formación.

**¿Qué opinión le merece la oferta de formación presente en España?**

En cuanto a formación para cuidadores y experimentadores existen algunos cursos de buen nivel, pero creo que debería ampliarse mucho más la oferta de formación en España.

**Cite dos profesionales a los que sería interesante poder realizar este cuestionario**

Anna Vilà (veterinaria de Harlan laboratories S.A), Luis Parra (de Laboratorios Ferrer).

