



# ANIMALES

*de laboratorio*

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



## Índice

### 9 Noticias de la SECAL

- Resumen de la reunión de la Junta de Gobierno de la SECAL de 28 de Junio de 2011
- Resumen del Informe de Evaluación de la Política de Bienestar Animal de la Unión Europea, relacionada con la experimentación animal

### 21 Artículos

- Evaluación y comparación de tres líneas de ratas como biomodelos en ensayos de genotoxicidad

### 35 Técnicas

- Canulación crónica de la arteria carótida en el ratón

### 41 Presión positiva

- De la idea a la píldora: el descubrimiento de nuevos fármacos

### 47 ¿Y tú que opinas?

- Dilatación abdominal en peces, Zebra fish (*Danio rerio*)
- El lagarto canario *Gallotia galloti* como animal de laboratorio

### 57 Entrevista

- M. Antonia Rubio Caballero

Harlan Laboratories

RccHan™:WIST Rat



**Live long. Live well.**

Harlan Laboratories Models S.L.  
Telf. 00.34.93.866.1261  
Fax 00.34.93.866.0373  
harlanclientes@harlan.com  
www.harlan.com

**harlan™**  
Helping you do research better





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

<http://www.secal.es>

## GRUPO EDITOR

### DIRECTORA

Teresa Rodrigo Calduch  
[direccion.revista@secal.es](mailto:direccion.revista@secal.es)

### SUBDIRECTORA

Silvia Gómez Fernández  
[direccion.revista@secal.es](mailto:direccion.revista@secal.es)

## RESPONSABLES SECCIONES

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

### EDITORA DE ESTILO

Olga Fernández Rodríguez

### PUBLICIDAD

Nieves Salvador Cabos  
[publicidad.revista@secal.es](mailto:publicidad.revista@secal.es)

## DISTRIBUCIÓN DE REVISTA

Carmina F. Criado

### DISEÑA - IMPRIME

Henargraf  
[direccion@henargraf.com](mailto:direccion@henargraf.com)

### DEPÓSITO LEGAL

M-1362-1999

Fotografía de portada de  
Julia María Samos Juárez

Con la publicación el 20 de octubre de 2010 de la Directiva 2010/63/UE relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos, se derogó la que hasta ese momento había sido la base normativa desde 1986.

Hemos convivido durante bastantes años con la Directiva 86/609/CEEA, una normativa que aunque con sus lagunas y limitaciones, nos ha permitido avanzar respecto al bienestar animal, mejora de las instalaciones y condiciones en las que se mantienen a los animales, etc. Qué nos ha aportado esta directiva a nivel europeo, al igual que sus deficiencias, podemos verlo en el resumen del Informe de Bienestar Animal en la Unión Europea que se presenta en este número de la revista.

Sin duda, la nueva directiva supondrá un avance en materia de protección animal y debería llenar los vacíos de la anterior. Pero como siempre ocurre con las nuevas normativas, nos plantea una serie de preguntas e inquietudes a la hora de interpretarla y vislumbrar su alcance. Tanto es así que en el próximo congreso de SECAL que se celebrará este noviembre se ha programado una sesión precisamente sobre los cambios legislativos, a la que os animamos a asistir para poder plantear y discutir todas aquellas inquietudes que la nueva directiva os haya provocado.

Pero independientemente de los cambios legislativos, lo que tenemos claro es nuestro deber de avanzar en la ciencia del animal de laboratorio y mejorar la calidad de los resultados experimentales. En este número podéis ver un ejemplo de ello. Desde una exposición del proceso de desarrollo de un fármaco que encontrareis en la sección de presión positiva, a la importancia de la selección del modelo experimental adecuado para la obtención de los mejores resultados que refleja el artículo de este número, así como al refinamiento en la extracción de muestras continuas que se presenta en la sección de técnicas. Todo ello en pro de la calidad del animal y de la investigación.



## JAX<sup>®</sup> Sperm Cryo Kit

by the Jackson Laboratory



Exclusively marketed in Europe<sup>1</sup> by JANVIER

*JAX<sup>®</sup> is a registered trademark of The Jackson Laboratory, all rights reserved.*



## JUNTA DE GOBIERNO DE LA SECAL

### PRESIDENCIA:

Manuel Moreno Calle (2007-2011)\*  
presidencia@secal.es

### VICEPRESIDENCIA:

Belén Pintado Sanjuanbenito  
(2009-2013)\*

### SECRETARÍA:

Dolores García Olmo (2007-2011)\*  
secretaria@secal.es

### VICESECRETARÍA:

Isabel Clara Rollán Delgado (2009-2013)\*

### TESORERÍA:

Jesús Martínez Palacio (2007-2011)\*  
tesoreria@secal.es

### VICETESORERÍA:

Nieves Salvador Cabos (2009-2013)\*

### VOCALÍAS:

María Rosa Arnau Díaz-Llanos (2009-2013)\*

José Luis Martín Barrasa (2009-2013)\*

Jesús Martín Zúñiga (2009-2013)\*

Inmaculada Noguera (2007-2011)\*

Teresa Rodrigo Calduch (2007-2011)\*

Ignacio Segovia Hijarrubia (2009-2013)\*

Hernán Serna Duque (2007-2011)\*

Joana Visa Esteve (2007-2011)\*

### \*PERÍODO DE PERMANENCIA EN LA JUNTA DE GOBIERNO.

#### SOC. BENEFACTORES:

ANADE

ANTONIO MATACHANA S.A.

BIOSIS S.L.

CENTRE D'ELEVAGE JANVIER

CHARLES RIVER LABORATORIES

DINOX S.L.

EBECO

EHRET GmbH&Co.KG

ETYCA S.L.

FAGESA BIOLAB

GLAXO SMITHKLINE

GRANJA S. BERNARDO

HARLAN LABORATORIES MODELS

NIRCO S.L.

NORAY BIOINFORMATICS S.L.U.

PANLAB S.L.

PROLABOR

RENTOKIL

RETENMAIER IBERICA S.L.

SOURALIT

SDS DIETEX FRANCE

STERILTECH S.L.

STERIS

VESTILAB S.A.

VIVOTECNIA

# Agenda de Actividades

## NOVIEMBRE 2011

Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
	1	2	3	4	5	6
7	8	9	10 Congreso Luso-Brasileño Patología Exp., Brasil	11 Congreso Luso-Brasileño Patología Exp., Brasil 12th eCopa Annual Workshop, Madrid	12 Congreso Luso-Brasileño Patología Exp., Brasil	13
14 I Simposio SCCAL, La Habana International workshop Zebrafish, Utrecht	15 I Simposio SCCAL, La Habana International workshop Zebrafish, Utrecht	16 I Simposio SCCAL, La Habana	17 I Simposio SCCAL, La Habana	18 I Simposio SCCAL, La Habana	19	20
21	22 XI Congreso SECAL 2011 - Valencia	23 XI Congreso SECAL 2011 - Valencia	24 XI Congreso SECAL 2011 - Valencia	25 XI Congreso SECAL 2011 - Valencia	26	27
28	29	30	31			

## ENERO 2012

Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
						1
2	3	4	5	6	7	8
9	10	11	12	13	14	15
16	17	18	19	20	21	22
23	24 I Encuentro Modelos Muriños, Valdivia (Chile)	25 I Encuentro Modelos Muriños, Valdivia (Chile)	26 I Encuentro Modelos Muriños, Valdivia (Chile)	27 I Encuentro Modelos Muriños, Valdivia (Chile)	28	29
30	31					

Más información: [www.secal.es](http://www.secal.es)



“Una estación de cambio debe ser fiable y segura. Ahora además es ligera porque está fabricada en plástico.”



Tecniplast presenta la siguiente etapa en la evolución de la famosa CS5. Ahora, gracias a un exclusivo proceso de producción, la CS5 EVO se fabrica en plástico. Así la cabina es más ligera, más fácil de limpiar, más eco-sostenible y con mejores prestaciones.

La nueva CS5 Evo con un nuevo diseño del plenum de aire de Alta Eficiencia y una tecnología de flujo laminar (ISO5) mejora las operaciones en su animalario:

1. Diseño innovativo específicamente desarrollado para Animalarios:
  - Eco-sostenible con materiales novedosos.
  - Ergonómico ofreciendo nuevos horizontes en términos de confort y seguridad a los usuarios.
2. Eficiencia mejorada.
  - Innovativa configuración de superficie de trabajo dual (Pendiente de Patente) que puede ser ajustada.
  - Reja de diseño revolucionario en el perímetro de la superficie de trabajo que recoge el aire del ambiente y reduce la obstrucción de los filtros, manteniendo óptimas cualidades en la barrera de flujo.
3. Más facilidad de limpieza, alta resistencia a los componentes Clorados y superficies y perfiles perfectamente redondeados y suaves.
4. Motores más eficientes para un mayor confort acústico y un menor coste energético.
5. Más opciones y accesorios: 2 versiones con accesorios a medida.



**40% MENOS PESO**  
en comparación con los modelos tradicionales

**3 años de garantía**

Pendiente de Patente y Diseño Registrado.



MÁS INFORMACIÓN EN [www.tecniplast.it](http://www.tecniplast.it)



**TECNIPLAST**  
innovation through passion<sup>SM</sup>



## Funcionalidad, Fiabilidad y Trazabilidad

premisas básicas para una investigación de calidad

### Economía de Mantenimiento

Los Racks ventilados IVC de Allentown posibilitan ampliar hasta dos semanas o más el cambio de jaulas, con un consumo eléctrico inferior a 25W por IVC



### Fiabilidad Contrastada

El sistema de filtraje MULTI-Fase, original de Aquaneering, ha demostrado ser el más eficaz y seguro en el campo de las instalaciones acuáticas



### Trazabilidad

Solamente SAFE puede garantizar una trazabilidad desde la materia prima (baby food) hasta la entrega del producto al usuario.



### Servicio Al Cliente

Garantizando constantemente una atención inmediata gracias a nuestras plataformas en Barcelona y Madrid

**Panlab, s.l.u.**

Tel: + 34 934 190 709  
info@panlab.com  
www.panlab.com

**Calidad y Experiencia**



XI Congreso  
**SECAL**, 2011

Sociedad Española  
para las Ciencias  
del Animal de Laboratorio



PALACIO DE CONGRESOS DE VALENCIA  
**22 al 25 de noviembre de 2011**





# Noticias de la SECAL

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



El pasado 28 de junio, tuvo lugar una Reunión Ordinaria de la Junta de Gobierno de la SECAL. La reunión se celebró en las dependencias del Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid. Estos son algunos de los asuntos que se debatieron:

### Consultas, informes y comunicaciones:

- A raíz de un debate surgido en SECAL-L, Manuel Moreno y Belén Pintado enviaron una **consulta al MARM sobre las categorías profesionales descritas en el RD 1201/2005**. La respuesta del Ministerio especificaba que el reconocimiento de una categoría, sólo facultaba al interesado para realizar las funciones correspondientes a dicha categoría. El Ministerio instó a los interesados a que revisasen la normativa de su Comunidad Autónoma correspondiente, por si especificaba algo más. Podéis consultar el debate íntegro en nuestra página web (<http://secal.es> > "Actividades" > "SECAL-L" > "los mejores debates de SECAL-L" > "Categorías profesionales – mayo 2011").
- El pasado mes de marzo, la UE abrió un plazo para enviar **sugerencias de mejora de las traducciones de la Directiva 2010/63/UE**. FELASA fue la entidad que coordinó esta acción. Belén Pintado recogió las sugerencias aportadas por los socios de la SECAL para el caso de la traducción española. Finalmente, se envió un documento elaborado por Presidencia.
- El pasado 27 de abril, Belén Pintado envió un escrito al Director del **diario "El País"**, en respuesta al artículo "Día Mundial del Animal de Laboratorio" publicado días antes. El artículo ponía de ma-

---

**28 DE JUNIO DE 2011**

---

nifiesto una serie de falsedades, como que la experimentación animal se mantenía por inercia o que el Gobierno no tomaba medidas para paliar el sufrimiento de los animales. La carta que envió la SECAL fue difundida a los socios a través de SECAL-L y la web (apartado "Actividades" > "Noticias"). Se pidió al diario su difusión, pero hasta hoy, no hemos recibido respuesta.

### Congresos:

- **Congreso Valencia 2011:** se ha obtenido el reconocimiento de interés sanitario por parte del Ministerio de Sanidad. Aún sigue abierto el plazo de inscripción, así que esperamos veros a todos muy pronto en Valencia. Más información sobre el congreso en (<http://www.uv.es/secal>).
- **Congreso Barcelona 2013:** se han constituido los comités científicos y organizador. Ambos ya están trabajando de cara al próximo evento.
- **Presidencia recibió un documento de propuesta para celebrar el congreso de SECAL 2015** en Cáceres, junto con SPCAL. Otra de las sedes que opta a la organización es Las Palmas de Gran Canaria. La próxima Junta será la que tome la decisión sobre la sede del congreso y lo presentará a la Asamblea para su aprobación.

### Formación:

- Se acuerda publicar el Libro Blanco de Formación en el área restringida de la página web (<http://www.secal.es> > "Formación" > "Convenios y ayudas de formación" > "Libro Blanco de Formación de la SECAL"). Se valora muy posi-





vamente el desarrollo de las Jornadas Técnicas y su promotor, propone una nueva línea de trabajo que transcurra paralela a ésta. Esta nueva línea consiste en que SECAL oferte sus propias actividades formativas. Se sugiere enlazar esta idea con la de formación online. Quedan concretar, entre otros aspectos, cómo se acreditarían estas actividades como formación continuada.

### Comunicación:

- La **Vocalía de Comunicación** propone que tras la buena acogida del programador/calendario de 2011, se empiece a trabajar en el del año que viene. Se prevé poder distribuirlos entre los socios en el congreso de Valencia. Por otro lado, se aprueba la elaboración de un Libro Blanco de Comunicación, que recoja las líneas principales de actuación de esta Vocalía.

### Relación de SECAL con otras entidades:

- **Patri Vergara** ha sido elegida **presidenta de ICLAS**. Asimismo, Javier Guillén formará parte del Comité Ejecutivo. Patri deja la representación de la SECAL en **FELASA**, por lo que la Junta propondrá un nuevo miembro.
- **Laboratory Animals Ltd.** busca estrategias eficientes para aumentar su factor de impacto. Por otro lado, pretende dar mayor difusión a las convocatorias de becas y ayudas que ofrece, así habrá un mayor número de entidades que se beneficien de este apoyo. Por otro lado, Javier Guillén ha entrado a formar parte del Consejo de Gobierno de esta entidad, al que ya pertenece José María Orellana.
- El pasado 17 de mayo, **FELASA** puso en circulación un par de **documentos** con objeto de que fueran valorados por las asociaciones que la conforman ("Rodent identification" y "Guidelines for the refinement of methods for genotyping genetically modified rodents"). A principios de junio y en representación de la SECAL, Belén Pintado mandó un escrito con las conclusiones. La

evaluación fue positiva para ambos documentos, con una única sugerencia sobre los métodos de extracción de ADN.

- La SECAL ha participado en el último **Consejo General Ordinario de COSCE** (Confederación de Sociedades Científicas de España), interviniendo en las elecciones para la renovación parcial de su Junta de Gobierno.

### Otros asuntos:

- **Tesorería** comunica que se ha decidido cobrar las cuotas anuales de los socios a principios de año. Antes de proceder al cargo, se anunciará a través de SECAL-L, tal y como se ha hecho en el 2011.
- Dolores G. Olmo y Marta Giral presentan una **propuesta de mejora y ampliación de herramientas y recursos de la página web**, entre las que se incluyen: un motor de búsqueda, registro de usuarios y modificación de datos online, bolsa de trabajo, etcétera. La propuesta queda aprobada por unanimidad. En breve podremos ver los resultados.
- **Secretaría** informa que actualmente somos 445 socios y que en el 2011 se ha alcanzado el mayor número de altas de socios desde el año que se constituyó la Sociedad.
- Ya se está realizando la **reimpresión del libro de "Ciencia y Tecnología del Animal de Laboratorio"**, costado en su totalidad por la Universidad de Alcalá de Henares. Se estima que en breve verá la luz.
- Hernán Serna informa que hay una iniciativa para crear la **Asociación Colombiana en Ciencia y Bienestar del Animal de Laboratorio (ACCBAL)**, y solicitó el apoyo de la SECAL para materializarla. Los miembros de la Junta son unánimes en el apoyo de esta iniciativa y contribuirán en todo lo necesario, dentro de las posibilidades de la SECAL.

La próxima reunión de la Junta de Gobierno será por teleconferencia y tendrá lugar el 20 de septiembre de 2011.



## **Evaluación de la Política de Bienestar Animal de la Unión Europea, relacionada con la experimentación animal.**

*Resumen del Análisis del Informe realizado por SECAL  
Elaborado por J.M. Zúñiga. Junta Directiva.*

**OCTUBRE DE 2011**

### **Antecedentes**

Durante los últimos 30 años, la Unión Europea (UE) ha adoptado una serie de legislaciones referentes a la protección de los animales, entre los que se incluyen los utilizados para fines científicos. Por otra parte, la UE se ha adherido al principio de que más allá de los objetivos específicos, las personas tienen el deber ético de atender a los animales que están bajo su responsabilidad. La legislación en estos campos refleja la importancia cada vez mayor que otorga la opinión pública a la dimensión ética de las actividades económicas con animales.

En 2006, la Comisión adoptó el primer Plan de Acción de la UE sobre la Protección y Bienestar de los Animales 2006-2010 del que se describieron sus líneas estratégicas y sus acciones futuras. El Plan de Acción fue el primer documento que agrupaba en un solo texto los diferentes aspectos de la política de la UE sobre Bienestar Animal (BA).

### **La Evaluación**

En noviembre de 2009, las empresas inglesas GHK Consulting Ltd y ADAS UK Ltd fueron comisionadas por la Comisión Europea, Dirección General de Salud y Política de Consumidores (DG SANCO), para evaluar la política de la UE en lo que se refiere a bienestar animal (EUPAW: EU Policy on Animal Welfare -Siglas de Política de la Unión Europea en Bienestar Animal), para animales de granja, de experimentación, de compañía y silvestres que se mantienen en cautividad o se someten a tratamientos controlados por los seres humanos. La evaluación pretende analizar hasta qué punto las actuaciones en bienestar dirigidas a los animales

pueden afectar al funcionamiento del mercado interno de la UE, y analiza cuatro posibles tipos de acción: (i) legislación, (ii) investigación, (iii) comunicación y (iv) actividades internacionales. Esta evaluación se ha basado en un conjunto de preguntas concretas con los siguientes objetivos:

- Analizar los posibles resultados positivos y/o negativos de la política de la UE sobre BA y compararlos con los objetivos.
- Valorar la eficiencia de la política a la hora de satisfacer estos objetivos y su coherencia con las actuaciones en otras áreas.
- Determinar si es necesario realizar cambios en la política sobre BA y sugerir posibles mejoras.
- Realizar recomendaciones para el diseño de la futura política, teniendo en cuenta los aspectos socioeconómicos.

### **Impacto del uso de animales de experimentación en la UE**

El uso de Animales de Experimentación (AE) se produce en una escala menor que la de los animales de granja, pero juega un papel importante en una variedad de investigación y desarrollo (I+D). Se calcula en torno a los 12 millones/año. Aunque el informe no aporta un número concreto, se estima en varias docenas el número de establecimientos criadores y proveedores de animales con fines experimentales. Cada año se inician aproximadamente 9.300 nuevos proyectos de I+D en la





UE-25 que involucran el uso de animales, y que a menudo duran varios años. La media de coste por proyecto de investigación se estima en unos 300.000 € en tres años. Esto sugiere que los gastos anuales son del orden de 3.000 millones de euros para proyectos de investigación que utilizan animales. Sobre esta base, el número de personas empleadas en proyectos de I+D con animales en la UE se estima en unas 28.000. El desglose porcentual en relación al lugar en el que se realizan los proyectos de investigación es el siguiente:

- Universidades: 68% de los proyectos, aproximadamente.
- Organizaciones comerciales, tipo laboratorios farmacéuticos: 12,6%
- Institutos o centros de validación estatales: 3,6%
- Otros organismos públicos: 9,4%
- Organizaciones sin ánimo de lucro: 4,2%
- Hospitales (1,2%) y Laboratorios de salud pública (0,6%)

Los sectores industriales que usan animales de experimentación son el farmacéutico, el químico, y los productores de pesticidas, alimentos y piensos. Colectivamente suponen unas 343.000 empresas en la UE, con una facturación de 1.680 mil x 10<sup>6</sup> €, ocupando a un número estimado de 6.5 10<sup>6</sup> de personas.

## La Encuesta de Evaluación

Como ya hemos indicado, la evaluación se realizó mediante una serie de preguntas muy concretas. Después de haber sido valorada por varios miembros de la SECAL, consideramos que el método de rastreo e identificación del problema mediante una encuesta, parece acertado. Los tamaños de muestra en los diferentes ítems de consulta son bastante adecuados y pueden dar resultados objetivos de la EUPAW, aunque creemos que son más aplicables para la UE de los 15, y menos para la UE de los 27, especialmente los países del Este de nueva incorporación.

Coincidimos con la mayoría de las consideraciones realizadas, aunque añadimos diferentes comentarios en referencia a los animales de experimentación. Pre-

sentamos para cada pregunta una valoración desde nuestro punto de vista.

### **Pregunta 1. ¿En qué medida la legislación de la UE sobre BA ha conseguido su principal objetivo, es decir, mejorar las condiciones de bienestar de los animales en el interior de la Unión?**

Esta pregunta es la que ocupa al menos el 50% de la evaluación y en ella se plantean las cuestiones más relevantes.

#### **Sobre la permisividad de la Directiva 86/609/CEE**

Coincidimos en la lentitud de aplicación de la Directiva, en especial en los países en vías de desarrollo de la UE, frente a otros con niveles de cumplimiento muy superiores. En general la legislación NO ha sido bien acogida por los usuarios. Su cumplimiento no se ha materializado hasta la puesta en marcha de los comités éticos de experimentación animal (CEEA), por imperativo de las instituciones oficiales financiadoras de I+D+i y como exigencia indirecta de los Comités Evaluadores de las revistas científicas con índice de impacto.

Las instalaciones de producción y experimentación animal (EA) se han ido mejorando y esto ha permitido aplicar los mínimos legales establecidos de estabulación y cría. Igualmente, los profesionales del sector (responsables o directores técnicos de instalaciones) han favorecido su cumplimiento.

Es muy acertado el desarrollo de las 3Rs, si bien no queda claro que se esté generalizando su uso en el caso de evaluación de productos químicos en sentido amplio y que su implantación esté asociada a una reducción cuantitativa significativa en el número de AE utilizados. En el periodo de valoración (2002-2008), no se aprecia una reducción apreciable en el uso de animales en los países claves (Francia, Inglaterra, Alemania) y no se dispone de información de países importantes como Suiza (Tabla 1).



# Noticias de la SECAL

PAIS	2002	2008	% cambio
Belgium	695.091	725.370	4%
Denmark	371.072	297.568	-20%
Germany	2.071.568	2.021.782	-2%
Greece	515.423	28.021	-95%
<b>Spain</b>	<b>262.042</b>	<b>897.859</b>	<b>243%</b>
France	2.212.294	2.328.380	5%
Ireland	52.203	112.835	116%
Italy	924.889	864.318	-7%
Luxembourg	5.320	3.830	-28%
Netherlands	640.930	501.056	-22%
Austria	192.062	220.456	15%
Portugal	44.577	50.888	14%
Finland	644.880	138.600	-79%
Sweden	281.184	484.604	72%
UK	1.817.485	2.266.884	25%
EU15	10.731.020	10.942.451	2%

Tabla 1.- Tendencias del uso de animales de experimentación en la EU entre 2002 y 2008.

## Sobre el transporte

Aún no se ha conseguido estandarizar un sistema adecuado de transporte para los animales de experimentación, posiblemente debido a su escasa importancia cuantitativa. Existen iniciativas por parte de algunas empresas proveedoras de animales de experimentación, mediante la adecuación de vehículos climatizados, o bien interrumpiendo el transporte en países mediterráneos durante los meses estivales. Pero sólo se aplican en grandes ciudades o áreas de mayor consumo. Las empresas de transporte habituales NO quieren asumir el riesgo del transporte de este tipo de animales, ni los incrementos de inversión en vehículos especiales para ello. Con cierta frecuencia y por un

transporte inadecuado, aparecen lotes de animales muertos por asfixia o similar. Este hecho se ha visto reducido en los últimos años, si bien se siguen dando casos.

Se debería de implementar una legislación o articulado específico más punitivo en el tema de transporte de animales de experimentación. Los usuarios deben ser conscientes de la importancia ética y de bienestar de un transporte adecuado e incluir el sobre-coste de un transporte correcto de puerta a puerta, en el precio final del animal, al solicitar los proyectos de I+D+i.

## Sobre las inspecciones

Coincidimos con el informe sobre la disparidad de criterios y el grado de eficacia y periodicidad de las inspecciones. En el caso de España, esta periodicidad varía entre comunidades autónomas, no existiendo criterios estandarizados lo que contribuye a que se mantengan instalaciones no autorizadas.

**Pregunta 2. ¿En qué medida la legislación de la UE sobre la protección de los animales ha asegurado el correcto funcionamiento del mercado único para las actividades afectadas?**

Como punto de partida es necesario hacer una reflexión sobre la armonización de la legislación entre los países de la UE.

## Sobre la armonización de la legislación

En cuanto a la armonización, son bien patentes las diferencias entre países y su grado de cumplimiento. Estas diferencias se dan incluso dentro de un mismo país, como es el caso de España, entre autonomías, lo que acentúa el nivel de incumplimiento. A pesar de ello, en los 6 años de evaluación (2002-2008), ha existido una aplicación progresiva y generalizada de la Directiva, en relación a las instalaciones, manejo y mantenimiento de los animales. La mayoría de los países miembro la han adoptado creando legislaciones específicas de ámbito nacional y/o regional. Desconocemos el estado de los nuevos países incorporados a la UE.





Coincidimos en que la Directiva de 1986 estuvo en vigor casi 25 años y en este período hubo cambios apreciables en la sensibilidad social frente al uso de animales, la puesta a punto de los sistemas de registros de instalaciones y su inspección, y otros muchos aspectos relacionados con los AE. Pieza clave ha sido la puesta en marcha de los CEEA que eran inexistentes en los países menos desarrollados.

La nueva Directiva viene a ratificar lo que se está aplicando en bastantes estados miembros, y pasará de ser una simple guía de recomendaciones a una directriz de aplicación real al incluir los niveles permisibles de sufrimiento de los procedimientos, y otros aspectos concretos tendentes a mejorar el estado de los animales en sentido amplio.

### **Efectos sobre el comercio de productos relacionados**

En lo referente al comercio de animales de experimentación, resulta preocupante la tendencia a concentrar la producción en determinados países miembros y que se dejen de producir *in situ*. Además de poder provocar desabastecimiento por circunstancias empresariales y problemas de contaminación de las barreras, implica transporte, aún deficiente para este tipo de animales. Habría que evaluar el impacto comercial con mayor visión, dado que en los últimos 10 años han aparecido los animales modificados genéticamente, se han utilizado otras especies animales, y ha habido una reducción apreciable en la demanda de los modelos clásicos.

En cuanto a las tendencias en el uso de animales de experimentación, el desproporcionado incremento que se reporta para España (243%), se puede deber en gran medida a que a partir de 2005-2006 se generalizó el trasvase de la información estadística desde los centros registrados a las CCAA y de éstas a la Autoridad Nacional.

En referencia a “si la legislación nacional de BA y su aplicación ha podido afectar al mercado interior”, habría que añadir que la aplicación de la Directiva, y por añadidura de la política sobre BA, ha podido suponer un incremento en el coste de los animales y de la investigación en I+D+i, tal como manifiestan algunos colectivos de investigadores. En el mismo sentido se pronuncian las empresas productoras y las instituciones privadas de I+D, tipo farmacéuticas, laboratorios de ensayos biológicos o similares.

***Pregunta 3. ¿En qué medida la financiación que realiza la UE para investigación y asesoramiento en BA ha contribuido al desarrollo de actividades científicas específicas en el campo de la legislación, la comunicación, o de cara a iniciativas internacionales?***

Es evidente que se debe hacer un mayor esfuerzo de financiación de proyectos que reviertan en un aumento del BA. Coincidimos con el informe en la importancia del refinamiento. No obstante, no se refleja en el informe la proliferación de estudios de preferencias y enriquecimiento ambiental realizados principalmente entre 1995 y 2010, que han supuesto una mejora en el mantenimiento de los animales de laboratorio en cautividad.

Se deben potenciar estudios dirigidos a mejorar las condiciones de mantenimiento mediante la aplicación de nuevas técnicas de enriquecimiento. Asimismo, resulta necesario potenciar estudios relacionados con la reducción de técnicas invasivas, aplicación de métodos de reducción del dolor y sufrimiento. Reevaluar los criterios de punto final, las fichas de supervisión del estado del animal, los índices de BA y las escalas de severidad, generando recomendaciones para las diferentes áreas de conocimiento de la Biomedicina. La nueva Directiva articula los grados de severidad de los procedimientos, aportando una nueva herramienta de evaluación legal de cara a los CEEA, lo que supone un gran paso adelante.





# Noticias de la SECAL

**Pregunta 4. ¿En qué medida las acciones de la UE destinadas a comunicar los resultados a los agentes y a la opinión pública han contribuido a aumentar la concienciación y la responsabilidad respecto al BA?**

Aunque se valora la aparición y desarrollo de programas formativos e informativos *online*, consideramos que en esta cuestión no se ha realizado una evaluación adecuada. En el informe se realizan una serie de recomendaciones y se plantean estrategias a desarrollar para evaluar el estado de la cuestión, pero no se analiza realmente la situación.

En varios países de la UE existe cierta permisividad por parte de las autoridades hacia los grupos extremistas representados por el Frente de Liberación Animal (FLA). Se observa un incremento de sus acciones, a menudo contra las personas y la propiedad, que se quedan impunes y son libremente divulgadas por medio de las redes sociales u otros foros. Estas actuaciones deberían de ser perseguidas como delitos y se debería de plantear para ellas el criterio de **"TOLERANCIA CERO"**.

Da la sensación de que la EA se "esconde" en su verdadera dimensión y se considera un "mal menor". Por el contrario, la UE debería de desarrollar una política de divulgación mediante campañas informativas y formativas del alcance e importancia para la salud, la seguridad alimentaria y otras prioridades sociales. A la par, informar y divulgar el desarrollo y potencial del principio de las 3Rs, la proliferación de redes o grupos estructurados de estudio y evaluación de la ética y la moral en el uso de animales en experimentación, y las actuaciones de los CEEA. Queremos destacar en ese sentido, y como modelo el ejemplo de divulgación realizado en Brasil ("*Ética na Pesquisa*", ver en [www.eticanapesquisa.org.br](http://www.eticanapesquisa.org.br)).

Finalmente, se debe considerar que el "etiquetado de BA" también es aplicable a los productos o procesos de investigación realizados según los requerimientos establecidos tanto por la legislación como por los *Animal Welfare Center*.

**Pregunta 5. ¿En qué medida las iniciativas internacionales de la UE respecto del BA han contribuido a elevar la concienciación y a crear unos conocimientos e ideas comunes sobre los problemas y estándares del bienestar animal a nivel mundial?**

Creemos que para esta pregunta no se ha realizado una evaluación real de la situación, al menos en lo referente a la EA. Existen dos elementos de actuación en los que la UE ha contribuido a la implantación de los estándares de BA en otras regiones del mundo.

En primer lugar, se ha realizado un esfuerzo en la exportación del modelo formativo de los profesionales relacionados con la EA (técnicos, experimentadores e investigadores). Partiendo de las recomendaciones de FELASA y de redes tipo ALFA (América Latina Formación Académica), y las Agencias de Cooperación Internacional tipo AECI.

En segundo lugar, se ha exportado a terceros países los estándares aplicados a los procesos de mantenimiento y uso de los animales, sobre todo en procesos que conllevan dolor o sufrimiento. En este caso se insiste en la importancia de la aplicación y exportación de las Normas OCDE y de las Normas REACH específicas de la UE. Es decir, existen actuaciones concretas que se deben potenciar, y en las que la UE debe jugar un papel fundamental y de referente mundial.

**Pregunta 6. ¿En qué medida las iniciativas internacionales de la UE sobre bienestar animal han contribuido a establecer condiciones de mercado homogéneas entre las empresas de la UE y las empresas de terceros países que exportan a la UE?**





Coincidimos con el informe en que el papel de la UE debe ser fundamental en la activación y desarrollo de políticas de BA homogéneas entre terceros países. Esto es importante en el caso de los países emergentes o en vías desarrollo, en especial y para el caso de España por su relación con Latinoamérica. Para productos químicos en general, provenientes de estos países, incluido fármacos y cosméticos, se deberían requerir al menos los niveles exigidos por el informe REACH. En el caso de países como Canadá, Japón o EEUU, disponen de legislación cada vez más restrictiva en BA. La mayoría de las empresas multinacionales de los países más desarrollados disponen de una política propia sobre BA, con tendencia a disponer, cada vez más de la acreditación AAALAC (<http://www.aaalac.org/>). Dicha situación afecta a las instituciones o empresas subcontratadas para la realización del I+D+i.

**Pregunta 7. ¿En qué medida los instrumentos financieros actuales y los recursos financieros a nivel de la UE se han adaptado a las necesidades de la EUPAW? ¿Sería necesario establecer instrumentos financieros específicos y/o recursos especializados para iniciativas de la UE relativas con el BA?**

Coincidimos en que la aplicación de la Directiva ha servido como argumento y motivación para elaborar legislaciones más específicas y concretas en los países de la UE. Esto ha supuesto inversiones en la mejora de las instalaciones, se ha incentivado la formación y cualificación del personal, y se han adoptado condiciones de BA de manera generalizada. En definitiva, ha existido una adaptación de los recursos financieros a las necesidades de EUPAW. En este sentido, la contribución de los fondos FEDER ha sido clave para los países periféricos de la UE. Igualmente coincidimos en las actuaciones identificadas que exigirían financiación y recursos, a las que añadimos las siguientes:

- Apoyar y financiar programas de información y formación de la sociedad en términos de BA e importancia de la EA.
- Apoyar y cofinanciar programas de intercambio de información sobre ciencia y tecnología del AE y asesoramiento del diseño, construcción y optimización de instalaciones destinadas a la producción y/o experimentación.
- Apoyar el desarrollo del I+D en toxicología de cara a la validación y registro de productos procedentes especialmente de países emergentes.

**Pregunta 8. ¿En qué medida la EUPAW aborda las necesidades de los interesados y de los ciudadanos de la UE? ¿Qué áreas necesitan cambios, en lo que se refiere a sus objetivos, ámbitos, sistemas de gestión o procesos? ¿Qué tipo de cambios?**

Coincidimos tanto en el análisis, como en las prioridades indicadas en el informe. Se deberían dedicar esfuerzos a informar de las consecuencias beneficiosas de la aplicación del BA y al equilibrio entre los colectivos que quieren mayores cotas de BA y los que “aplaudirían” su reducción, sobre todo para reducir costes económicos. Enfatizar que el BA y la ciencia de calidad van cogidos de la mano y garantizan mejores resultados en I+D+i, sobre todo a medio y largo plazo.

**Pregunta 9. ¿En qué medida la intervención, objetivos y actividades vinculados a la EUPAW suponen un apoyo a otras políticas de la Unión Europea, o puedan entrar en conflicto con alguna de ellas? ¿En qué medida los elementos de la lógica de intervención de la EUPAW se complementan internamente, se dan apoyo mutuo y son coherentes? ¿Qué grado de éxito ha tenido la EUPAW a la hora de promover la coherencia y la complementariedad necesaria entre las distintas políticas de la UE, en colaboración con la Comisión y los Estados Miembro?**





# Noticias de la SECAL

Coincidimos con el informe en la práctica ausencia de áreas de conflicto con otras políticas de la UE. En relación a posibles efectos sobre el Mercado Interior, la política de la UE ha contribuido a mejorar las instalaciones de animales, en los países miembros, primando la mejora de su estado de bienestar. Esto ha facilitado mejores resultados en investigación y, por tanto, ha hecho más eficientes a los países de la UE en lo referente a la obtención de nuevos medicamentos y nuevos avances en Biomedicina.

Respecto al comercio exterior, ha permitido el desarrollo de Biotecnología de calidad al mismo nivel que USA, Canadá o Japón, y está contribuyendo a que tanto países en vías de desarrollo como los emergentes adquieran el mismo compromiso de aplicación de bienestar en la EA. Sin duda, el marchamo de Bienestar en todos los procesos genera una mejora en la productividad y en la imagen empresarial.

**Pregunta 10. ¿En qué medida las políticas de bienestar animal contribuyen a la sostenibilidad económica de los sectores afectados (de animales de explotaciones agrícolas y de animales de experimentación)?**

Los comentarios del informe para esta cuestión están en línea con la pregunta anterior en cuanto a (i) la mejora de calidad de las empresas (ii) la imagen pública de la EA, (iii) las cargas administrativas y (iv) el nivel de cumplimiento de la Normativa. Otro aspecto es la reducción del número de animales utilizados, en especial los incluidos en el grupo de especies socialmente sensibles (perro, gato, primate) cuyo coste de mantenimiento es más elevado y encierra una mayor desaprobarción social. Por otra parte, una mejor imagen social, como consecuencia de la aplicación de la EUPAW,

contribuye a potenciar el desarrollo de la investigación en EA. Igualmente facilita la incorporación de nuevos investigadores y reduce la deslocalización de la actividad hacia terceros países más tolerantes con bajos niveles de bienestar.

**Pregunta 11. ¿Qué costes conlleva la gestión de la EUPAW para las administraciones públicas de los Estados Miembro?**

Se debería de armonizar entre los estados miembros, y dentro de ellos a nivel de autonomías o regiones, los organismos responsables del control de los niveles de BA establecidos y del sistema de inspecciones. Se parte de que un sistema de inspecciones sistemático y periódico contribuiría al cumplimiento de la legislación actual en términos de BA de manera efectiva. No se deben descartar las penalizaciones mediante multas y expedientes contra las personas físicas o instituciones que incumplen la ley. En este sentido, se considera que en determinados casos las inspecciones siguen siendo permisivas o poco eficaces.

Se da la circunstancia de que una vez registrados los establecimientos no se hacen posteriores seguimientos. En este sentido, se debería de articular y uniformar el sistema de inspecciones y la periodicidad de las mismas. Coincidimos en que la responsabilidad debe ser compartida entre las administraciones nacionales, regionales y locales y cruzar la información entre ellas. Creemos que el dato estimado de sólo 450 inspecciones para el conjunto de la UE por año es muy bajo.

*El presente texto es un resumen de un informe más completo en el que se incluyen las referencias. Se puede consultar en [www.secal.es](http://www.secal.es)*





Servicios para animalarios  
Formación del personal  
Diseño de instalaciones  
Consultoría y asesoramiento



## DIETAS PARA ANIMALES DE LABORATORIO

Las dietas SDS existen desde hace más de 40 años, se desarrollaron junto a las exigencias de la investigación, y se adaptan plenamente a las necesidades de cada animal y cada usuario: SDS propone dietas estándar, y dietas "SQC", que vienen con un certificado de análisis sobre 40 parámetros diferentes por lote. Se formulan todas estas dietas según una formulación fija, siguiendo las exigencias marcadas por las Buenas Prácticas de Laboratorio.

El embalaje y los tratamientos de esterilización son variados, y responden a las necesidades de los usuarios: doble embalaje, al vacío, irradiación a bajas o altas dosis.

SDS tiene dos líneas distintas de producción: una línea completamente vegetariana, y una línea que puede contener elementos orgánicos. Esto permite evitar todo riesgo de contaminación cruzada.

Además de estas dos líneas de producción, SDS cuenta con una unidad distinta, llamada el "pequeño SDS", donde se fabrican las dietas especiales: incorporación en el alimento de moléculas de investigación, fabricación de dietas a medida, en la cual colaboran nutricionistas profesionales.



**Alimentos**  
expandidos, en pellets,  
en polvo, alimentos  
especiales.



**Golosinas**  
y premios para todo  
tipo de animales.



**Lechos**  
vegetales, de álamo, de  
celulosa, de papel.



**Enriquecimiento**  
ambiental para todo  
tipo de animales.

[www.sdsdiets.com](http://www.sdsdiets.com)

the essential resource for quality research diets

SDS - Dietex France  
75 rue du Général Leclerc  
95210 SAINT GRATIEN - France  
Tel: +33 (0)1 30 10 94 94  
Fax: +33 (0)1 30 10 94 99  
Email: france@sdsdiets.com





# Artículos

**Daniel Francisco Arencibia Arrebola** Instituto Finlay, Cuba

**Luis Alfredo Rosario Fernández** Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL, U.H), Cuba

**Yolanda Emilia Suárez Fernández** Universidad Agraria de la Habana (UNAH), Cuba

**Alexis Vidal Novoa** Facultad de Biología (U.H), Cuba

## Evaluación y comparación de tres líneas de ratas como biomodelos de ensayos de genotoxicidad

### Introducción

Es conocido por la comunidad científica que la introducción en el mercado de un gran número de nuevos productos farmacéuticos ha tenido una doble consecuencia en nuestro entorno. Aunque muchos de estos compuestos han contribuido a mejorar la calidad de vida, un gran número están relacionados con determinados riesgos debido a su toxicidad. La legislación actual exige que, previamente al registro y comercialización, se evalúe la seguridad de todo tipo de producto, por lo que resulta imprescindible utilizar ensayos de toxicidad predictivos, con el fin de anular o minimizar el uso de compuestos en los que la relación riesgo/beneficio los declare no aptos para el uso social que fueron concebidos<sup>1</sup>.

Por lo general, los estudios mutagénicos y genotóxicos se llevan a cabo cuando ya se han realizado todos los estudios de toxicidad aguda potencial del producto a evaluar en dos especies, y por al menos dos vías de administración de manera independiente<sup>2</sup>. Con estos estudios se explora el riesgo asociado a daños directos o indirectos sobre el material genético, donde una respuesta positiva deroga por lo general el paso del producto a un segundo nivel de evaluación. En la

actualidad, se han descrito una amplia gama de ensayos tanto *in vivo* como *in vitro* capaces de detectar el daño genotóxico a los diferentes niveles de expresión, todos con una alta sensibilidad y especificidad<sup>3</sup>. A su vez, las agencias reguladoras han elaborado protocolos estrictos para la realización de los mismos y sugieren cual o cuales de ellos utilizar en cada momento, legándole un peso preponderante a los ensayos *in vivo*. Estos ensayos, además de ser costosos, tienen como principal desventaja la inexistencia de un consenso en el uso exclusivo de una especie animal determinada que reproduzca fielmente los procesos fisiológicos a semejanza de los humanos. Como regla general, el grupo de mamíferos más utilizado ha sido el de los roedores, principalmente las ratas y ratones<sup>4</sup>.

El problema principal al respecto radica en que los investigadores utilizan las diferentes líneas genéticas de ratas existentes del biomodelo de forma azarosa o por conveniencia, pero en la mayoría de los casos esta decisión está lejos de una base teórico-práctica que justifique la selección, fundamentalmente por la falta de estudios al respecto. Esto conduce a que en muchas ocasiones, los resultados obtenidos por diferentes grupos de investigación que trabajan productos semejan-





tes o del mismo grupo en diferentes momentos no puedan ser comparables, debido a que es conocido que las diferencias genéticas entre las líneas del biomodelo presentan diferenciaciones en la expresión de los daños a nivel del genoma<sup>5</sup>.

De ahí que en no pocas veces sea necesario repetir un estudio debido a que los controles negativos presentan niveles de daños semejantes a los controles positivos; aunque la peor de las consecuencias es realmente el enmascaramiento de las verdaderas potencialidades genotóxicas del producto a evaluar. Esto ocurre debido a que el biomodelo tiene una tasa muy baja de expresión del daño genotóxico y por ello, un mayor margen a la hora de emitir un criterio de producto seguro, lo que conduce a aceptar un compuesto seguro cuando realmente no lo sea; o por el contrario, cuando el biomodelo tiene una alta tasa de expresión del daño genotóxico y consecuentemente un menor margen para emitir un criterio de producto seguro, que entonces conduciría a desechar un producto seguro por concebirlo como genotóxico.<sup>5</sup>

Esta problemática conduce a pensar que en la actualidad, sólo aquellos productos que son muy seguros o muy genotóxicos son verdaderamente clasificados mientras que aquellos capaces de causar “pequeños” daños pudieran estar mal clasificados; de ahí la importancia de realizar un estudio comparativo de las tasas espontáneas e inducidas de daños genéticos en las líneas genéticas de ratas disponibles en nuestro país a los diferentes niveles de expresión y a través de diferentes técnicas, de forma tal que les permita a los toxicogenéticos contar con una herramienta potente, avalada estadísticamente, a la hora de seleccionar la línea genética de ratas para realizar los estudios de mutagénesis y carcinogénesis.

Por tanto, el objetivo de este estudio fue realizar la evaluación y comparación entre ratas de ambos sexos de las líneas genéticas Sprague Dawley, Lewis y Wistar, teniendo en cuenta su respuesta basal e inducida a sustancias mutagénicas como la ciclofosfamida (CF), en

el ensayo cometa alcalino de leucocitos de sangre periférica, ensayo de micronúcleos, aberraciones cromosómicas en eritrocitos de medula ósea y en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide.

## **Materiales y métodos**

### **Animales**

Para este estudio se utilizaron ratas de las líneas genéticas Sprague Dawley, Lewis y Wistar, adultos jóvenes de ambos sexos (6-8 semanas), cuyo peso corporal oscilaba entre 180-210 g al término de la cuarentena. Se mantuvieron en locales separados bajo condiciones controladas de temperatura ( $23 \pm 2^\circ \text{C}$ ) y humedad relativa ( $60 \% \pm 10 \%$ ) y con ciclos de luz-oscuridad de 12 h. El acceso al agua y al alimento fue *ad libitum*. El alimento suministrado fue pienso esterilizable para ratas y ratones. Estas características fueron comunes para todos los grupos experimentales evaluados en este ensayo. Durante todo el proceso experimental se respetaron los principios éticos establecidos para la investigación con animales de laboratorio, según los criterios éticos establecidos por el consejo canadiense de cuidado animal<sup>6</sup>.

### **Administración y dosificación**

En todos los grupos experimentales, la sustancia se administró en el horario de 10:30-11:30 a.m., y las concentraciones se ajustaron semanalmente en función del aumento del peso corporal. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en grupos de 5 animales/sexo/línea, con un total de 10 animales en las dos réplicas realizadas.

En el grupo experimental 1 se utilizaron animales no tratados como control negativo. A estos animales se les realizó la técnica de entubación gástrica para que estuvieran expuestos a las mismas condiciones de manejo que los demás grupos, durante un periodo de 14 días.

En el grupo experimental 2 se utilizó el Tween 65 al 2 %, puesto que es el vehículo más utilizado en la



# Artículos

mayoría de las preparaciones de sustancias oleosas, útil como agente tensoactivo<sup>7</sup>, y en el grupo experimental 3 se utilizó el NaCl al 0.9 %, útil como disolvente de la mayoría de las sustancias a preparar<sup>8</sup>. Ambas sustancias fueron administradas por vía oral a 2 ml/kg durante un periodo de 14 días y preparadas 2 horas antes de la administración.

En el grupo experimental 4 se utilizó como control positivo la CF en dosis de 50 mg/kg, por vía ip (Ledoxina®, Lemri S.A.), diluida en disolución salina (NaCl) al 0.9 %<sup>9</sup>. La disolución se administró inmediatamente después de ser preparada, a las 48 horas y luego a las 24 horas, antes de la eutanasia programada a la misma dosis antes descrita a razón de 10 ml/kg<sup>10</sup>.

Para el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide, se utilizaron ratas machos de cada línea evaluada, formando estos mismos grupos experimentales a la dosis y vía mencionada con anterioridad, sólo que la administración de cada una de estas sustancias fue durante 5 días consecutivos y luego estuvieron sin administrar 52 días (duración del ciclo espermático de la rata)<sup>8</sup>.

## Observaciones clínicas

Se realizaron dos observaciones clínicas diarias, en el horario comprendido entre las 8:30-10:30 a.m. y las 3:00-4:30 p.m. Durante cada observación se tuvo en cuenta el estado clínico general del animal, que incluía la palpación para la detección de lesiones, posibles afectaciones respiratorias, del sistema nervioso, cardiovascular, gastrointestinal, estado de la piel, pelo, coloración de las mucosas y ojos.

## Eutanasia

A todos los animales se les practicó la eutanasia bajo atmósfera de éter hasta la pérdida total de los reflejos, para lo cual se tomaron las medidas de seguridad necesarias, siendo supervisado este proceso de forma tal que los animales no mostraran signos de dolor o sufrimiento. En el caso de los grupos experi-

mentales 1, 2 y 3, la eutanasia fue 24 h después de la última administración, en el caso del grupo experimental 4 tratado con CF, la eutanasia se realizó 24 horas después de la segunda administración del mutágeno, haciendo coincidir el día de la eutanasia en todos los casos.

## Exámenes realizados

### Ensayo cometa alcalino.

Al constatar la pérdida total de los reflejos, se extrajo una gota de sangre de la cola equivalente a 15-20  $\mu$ l. Luego se procedió a verter la sangre en un vial que contenía previamente 10  $\mu$ l de heparina sódica, manipulando las muestras a 4°C. El muestreo se realizó bajo luz atenuada para evitar daño adicional en el ADN y de esta forma, disminuir los falsos positivos y evitar que la manipulación constituyera un factor determinante de los resultados<sup>11</sup>.

Electroforesis alcalina de células individuales en leucocitos de sangre periférica: Las muestras (15-20  $\mu$ l) fueron suspendidas en 140  $\mu$ l de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5 %. Luego se añadieron láminas previamente preparadas con agarosa. Se sumergieron en solución de lisis (NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM y Tris 10 mM, 1 % Tritón, 10 % DMSO, pH 10) durante 1.5 h a 4°C y sometidas a 20 min de desenrollamiento en solución reguladora de electroforesis (3 % NaOH 10 N, 0.5 % EDTA 200 mM, pH > 13). La electroforesis se realizó a 300 mA y 1 V/cm durante 18-20 min. Las láminas fueron lavadas con solución reguladora de neutralización utilizando el Tris 0.4 M a pH 7.5 y aclaradas con agua destilada. La tinción se realizó con nitrato de plata al 0.05 %. Los nucleoides teñidos fueron evaluados empleando un microscopio de transmisión de luz, por tres observadores independientes, para luego establecer un promedio entre lecturas<sup>12, 13</sup>.

Análisis visual: Se analizaron 200 leucocitos/animal y 100 leucocitos/gel, cuantificándose 100 cometas en el centro del gel. Cada cometa fue clasificado acorde a la categoría o grado de daño correspondiente en el ADN entre 0 y 4. La magnitud del daño en el ADN fue





expresado en unidades arbitrarias (UA) de acuerdo con Collins en el año 2004<sup>12</sup>, a partir de valores posibles en un rango de 0-400<sup>14</sup>.

El procedimiento para el cálculo de (UA) puede ser resumido en la siguiente ecuación:

$$UA = 0 \times TCG0 + 1 \times TCG1 + 2 \times TCG2 + 3 \times TCG3 + 4 \times TCG4.$$

-TCG0= Total de células, grado 0 (células no dañadas).

-TCG1= Total de células, grado 1 (mínima frecuencia de lesiones en el ADN).

-TCG2= Total de células, grado 2 (daño bajo, con frecuencia baja de lesiones en el ADN).

-TCG3= Total de células, grado 3 (daño alto, con frecuencia alta de lesiones en el ADN).

-TCG4= Total de células, grado 4 (células totalmente dañadas).

#### Ensayo de micronúcleos en médula ósea.

Un fémur de cada animal fue extraído y la cavidad medular se lavó por flujo con 4 ml de suero bovino fetal. La médula así obtenida se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos y tras eliminar el sobrenadante, se realizó un frotis del botón celular en láminas portaobjetos<sup>15</sup>. Después de montadas las láminas (mínimo: 2/animal) se mantuvieron 24 horas a temperatura ambiente para su secado y posteriormente se fijaron en metanol absoluto durante 5 minutos, para su posterior tinción en Giemsa al 5% durante 12-15 minutos. Las láminas fueron codificadas, el análisis se realizó por tres observadores independientes y las observaciones realizadas "a ciegas". Se contabilizó la presencia de eritrocitos policromatófilos (EP) y normocromatófilos (EN) en 2000 células/animal. Además, se calculó la frecuencia de EP portadores de micronúcleos (MN-EP) en 2000 EP/animal, según los requisitos establecidos<sup>16</sup>. Posteriormente se calculó el índice de citotoxicidad dado por la relación de EP/EN de la población total de eritrocitos y el número de EP con 1 MN, 2 MN y >2 MN en cada grupo.

#### Ensayo de aberraciones cromosómicas en médula ósea.

En el horario de la mañana (2 horas antes de la eutanasia), la división celular en metafase se detuvo utilizando colchicina (6 mg/kg, vía ip). Un fémur de cada animal fue extraído y la cavidad medular se lavó con 3 ml de suero bovino fetal (SBF)<sup>16</sup>. La suspensión celular se centrifugó, eliminándose el sobrenadante. Después de un tratamiento hipotónico de las células del botón con KCl (0.075 M), se realizó una segunda centrifugación. El botón celular se fijó en una mezcla de metanol-ácido acético glacial (3:1) durante 15 minutos. Se realizaron 3 fijaciones con centrifugaciones sucesivas, y se extendieron en láminas húmedas con enfriamiento previo. Las láminas se secaron al aire y se tiñeron con solución de Giemsa al 10 % durante 30-35 min. Se contabilizaron 100 metafases por animal, determinándose el número de células con aberraciones, frecuencia de gaps y de rupturas e intercambios cromosómicos y cromatídicos<sup>16</sup>. También se calculó el índice mitótico IM % (porcentaje de metafases en 1000 células leíbles) y el número de células con poliploidía en 1000 células leíbles. Todas las determinaciones fueron realizadas por dos observadores, para luego establecer un promedio entre ambas.

#### Ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide.

Se realizó la extracción de ambos epidídimos, que se redujeron a pequeños fragmentos, siendo depositados en placas Petri que contenían 3 ml de solución isotónica de NaCl 0.9 %. La muestra se homogenizó con pipetas Pasteur<sup>16</sup>.

Conteo de espermatozoides: El contenido de la placa se colocó en un tubo graduado, al que se le añadió 0.05 ml de tripsina al 0.25 %. Transcurridos cinco minutos de tripsinización se le añadió 2 ml más de NaCl 0.9 %, luego se realizó una dilución del homogeneizado tripsinizado en NaCl - Formol al 1 % (1:10) y se colocó en una cámara de Neubauer, contándose ambos lados de la cámara al microscopio Olympus BH-2<sup>10, 17</sup>.



# Artículos

**Morfología del espermatozoide:** Al tubo que contenía la dilución del homogeneizado ya diluido se le añadió cinco gotas de eosina al 1 %, dejándolo reposar durante cinco minutos. Posteriormente, se extendió una gota sobre una lámina seca y se colocó el cubreobjeto<sup>16</sup>. Se prepararon dos láminas por animal y se analizaron 500 espermatozoides; las observaciones fueron realizadas “a ciegas” por dos observadores independientes para luego establecer un promedio entre ambos. El criterio de clasificación se basó en cabezas normales y anormales que incluye amorfas, banana, sin gancho y con dos colas, además se valoró el % de espermatozoides que contenían gota citoplasmática como indicador de inmadurez celular<sup>17</sup>.

## Análisis estadístico

Para las comparaciones entre todos los grupos y entre especies para analizar parámetros del ensayo cometa (UA y los diferentes niveles de daño) se utilizó la prueba U de Mann-Whitney<sup>16</sup>. Se estableció a priori un nivel de significación  $\alpha=0.05$ .

Para el caso del ensayo de micronúcleos y de aberraciones cromosómicas, se procedió a verificar los supuestos para realizar el análisis de varianza en las variables continuas frecuencia de EP portadores de micronúcleos, índice de citotoxicidad (EP/EN) y el índice mitótico. Los resultados obtenidos muestran que están distribuidos normalmente (normalidad, según el test de Kolmogorov-Smirnov), existe dependencia entre las observaciones y presentan homogeneidad de varianzas (test de Levene)<sup>16</sup>. Por tanto, se analizaron con el uso de esta prueba estableciéndose un nivel de significación de  $\alpha=0.05$ . Las variables categóricas (número total de MN, número de EP con 1 MN, 2 MN y >2 MN, número de células con aberraciones, frecuencia de gaps y de rupturas e intercambios cromosómicos y cromatídicos, así como el número de células con poliploidía), se analizaron mediante la prueba de Chi-cuadrado; el nivel de significación establecido fue de  $\alpha=0.01$ .

De igual forma, en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide se procedió a verificar los supuestos para realizar el análisis de varianza. Los re-

sultados obtenidos muestran que están distribuidos normalmente (normalidad, según el test de Kolmogorov-Smirnov), existe dependencia entre las observaciones y presentan homogeneidad de varianzas (prueba de Levene). Por tanto, todos los resultados se analizaron mediante el método de análisis de varianza (ANOVA)<sup>16</sup>, con un nivel de significación establecido de  $\alpha = 0.05$ . Todos los análisis se realizaron empleando el Statsoft for Windows. StatSoft, Inc. (2003). STATISTICA (data analysis software system), versión 6.

## Resultados y Discusión

El hecho de poder observarse y medirse el daño en células somáticas y germinales, evidencia que las dosis, vía y número de exposiciones fueron las apropiadas para no lograr daño sistémico, al no observarse animales con signos y síntomas indicativos de toxicidad.

En la Tabla 1 se observa que en las tres líneas de ratas evaluadas en el ensayo cometa alcalino difirieron los resultados entre los grupos controles negativos, sustancias vehículos 1 y 2 contra los resultados obtenidos con el uso de la CF. Por otro lado, se observó menor número de daño al ADN basal en la línea de ratas SD en ambos sexos. Se obtuvo un porcentaje de nucleoides con grado 0 en un rango entre  $78.21 \pm 9.10$ . Los resultados de inducción obtenidos con la CF no difirieron entre líneas, resultado que estuvo de manifiesto en ambos sexos. Además, se puede apreciar que en las tres líneas de ratas evaluadas la CF indujo un aumento de nucleoides de grado 1 y 2, y en menor porcentaje de grado 3 y 4, lo cual permite caracterizar el efecto mutagénico de la CF en este ensayo *in vivo*. Los resultados espontáneos e inducidos obtenidos en ratas SD en el ensayo cometa de leucocitos de sangre periférica concuerdan con los obtenidos por González y colaboradores (2004)<sup>18</sup>. El hecho de que ratas SD difirieran de forma significativa en las variables de daño medidas en el ensayo cometa con las otras dos líneas evaluadas, reporta una gran utilidad, ya que las ratas SD constituyen una línea heterogénea, con respuesta muy similar a la de las poblaciones humanas, justificando su uso





en la mayoría de los estudios farmacológicos y toxicológicos preclínicos de drogas, vacunas y otros productos<sup>19</sup>.

En la Tabla 2 se aprecian los resultados del ensayo de micronúcleos en médula ósea. La CF difirió nuevamente de los demás grupos en las tres líneas de ratas evaluadas. El menor resultado basal de citotoxicidad dado por la relación EP/EN se obtuvo en la línea de ratas SD en ambos sexos, rangos que ya fueron reportados por nuestro grupo de trabajo al utilizar esta línea de rata en estudios de antigenotoxicidad<sup>20</sup>. Resultados que difirieron de forma significativa entre esta línea y las ratas Lewis y Wistar. En la línea SD los resultados de citotoxicidad se encuentran entre  $1.18 \pm 0.06$  y el índice de genotoxicidad el cual igualmente difirió con las demás líneas de ratas se encuentra en el rango de un  $0.15 \pm 0.06$  % de eritrocitos policromáticos con micronúcleos. Igualmente la respuesta de esta línea de rata a la CF fue alta, pero menor a los resultados de clastogenicidad obtenidos en las líneas Lewis y Wistar en ambos sexos. Los resultados basales del total de MN en ratas SD fue bastante bajo al compararse con las demás líneas evaluadas y en ambos sexos estando en un rango entre 22-32 MN totales. Por otra parte, la CF indujo un número considerable de MN en esta línea de ratas, pero su mayor efecto clastogénico se logró en la línea de ratas Wistar y en machos. Las diferentes respuestas a la CF encontradas entre estas líneas de ratas se debe al factor metabólico del fármaco y en respuesta a diferentes niveles de expresión de los genes que codifican la enzima citocromo P-4501A1 en el hígado, ya que en estudios pasados se ha demostrado que existen diferencias moleculares y conformacionales en este enzima entre diferentes especies y entre diferentes líneas de ratas. Esta enzima hepática es fundamental en la fase I del metabolismo de xenobióticos, que participa en el metabolismo de la CF en el hígado al utilizarse como droga citotástica<sup>21, 22</sup>.

Los resultados del ensayo de aberraciones cromosómicas (Tabla 3), demuestran una vez más el uso más eficiente de ratas SD como biomodelos en los ensayos de genotoxicidad. Nuevamente, las variables analiza-

das teniendo en cuenta aberraciones de tipo estructural y el índice mitótico difirieron entre las ratas SD en ambos sexos al compararse con las líneas Lewis y Wistar. Se obtuvieron los resultados basales más bajos de células con aberraciones en ratas SD; estando en el rango entre 17-23, la CF indujo en esta línea de ratas entre 220-246 células totales con aberraciones. Pero su mayor efecto mutagénico se logró en la línea de ratas Lewis al inducir entre 342-360 células aberradas estructuralmente. Por otra parte, difirieron los índices mitóticos obtenidos entre la línea SD y las demás evaluadas, como parámetro fundamental de daño citotóxico. En la línea de ratas SD se obtuvieron los resultados de índice mitótico más altos, estando en el rango de 4.81-5.29 %, y el menor número de células con poliploidía (1-3) como parámetro de aberraciones de tipo numérico, así como el menor número de aberraciones de tipo Gaps (4-8). Estos parámetros difirieron entre esta línea y las demás evaluadas y en ambos sexos. Tanto en la línea SD como en la Wistar y Lewis, la CF indujo altos índices de citotoxicidad y genotoxicidad. En la línea de ratas Wistar llegó a inducir la formación de 45-48 metafases con poliploidía y de 99-100 células con aberraciones tipo Gaps. Además, en esta misma línea de ratas fue capaz de disminuir el porcentaje de células en metafase (IM), estando en el rango entre 2.93-3.02%. Los resultados de aberraciones cromosómicas endógenas e inducidas en ratas SD concuerdan con los obtenidos por nuestro grupo de trabajo, al evaluar dos mutágenos en diferentes diseños de dosis y número de exposiciones utilizando este biomodelo<sup>23</sup>.

La Tabla 4 muestra los resultados del ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide, al evaluar ratas SD, Lewis y Wistar machos. Las ratas SD machos superaron a las demás líneas evaluadas en cuanto al número de espermatozoides normales de forma basal, estando en el rango de  $455.3 \pm 19.4$ . De las otras dos líneas evaluadas, la que mayores resultados de espermatozoides anómalos basales obtuvo fue la Lewis, con  $75.1 \pm 8.1$  en 500 células contables. Por otro lado, en las tres líneas evaluadas se logró un ambiente ge-



# Artículos

notóxico en las células germinales con el uso de la CF, obteniéndose mayores resultados de inducción de espermatozoides anómalos en la línea de ratas Lewis, con  $36.2 \pm 9.7$  espermatozoides dañados en un total de 500 células registradas como promedio. A su vez, al inducir la CF estas formas anómalas justifica su uso como control positivo en protocolos de estudios de teratogénesis y fertilidad<sup>24</sup>, y al inducir un alto efecto citotóxico y genotóxico en células germinales justifica el uso de la rata como biomodelo experimental en estudios de toxicología de la reproducción<sup>25-28</sup>.

Se obtuvo como resultado final que la línea de ratas SD en ambos sexos difiere significativamente de las demás líneas en las que se encontraron los índices espontáneos más bajos e inducidos aceptables con CF, teniendo en cuenta los indicadores tales como concentración espermática en epidídimos, frecuencia espontánea de cabezas de espermatozoides anómalas, número de eritrocitos en médula ósea con micronúcleos, índice de citotoxicidad (relación entre eritrocitos jóvenes/eritrocitos maduros), total de células con aberraciones estructurales en los cromosomas, índice mitótico (número de células que se encontraban en la fase de división celular de metafase) y el porcentaje de leucocitos en sangre periférica que experimentan daño en el ADN según niveles de menor a mayor daño.

Este trabajo permitirá utilizar la mejor línea de ratas como biomodelo en los ensayos de genotoxicidad y antígenotoxicidad de productos naturales, fármacos, vacunas y otros. Además conducen definitivamente a una disminución de los costos totales en los ensayos de toxicogenética. Desde el punto de vista científico y social, este estudio permitirá una evaluación objetiva del potencial genotóxico de los productos a evaluar y consecuentemente resguardar la seguridad del paciente o consumidor.

De forma bioética contribuye a impulsar diseños racionales de los experimentos y con ello, a la disminución en el número de animales de experimentación, cumpliendo de esta forma con el principio de las tres Rs (Reemplazo, Reducción y Refinamiento) planteado

por las sociedades protectoras del bienestar animal y las directivas de las agencias reguladoras de medicamentos.

## Bibliografía

1. Mortelmans K. and Rupa D. *Current in genetic Toxicology Testing for Microbiologist*. Advan Appl Microbiol 2004, 56: 379-97.
2. Arencibia D.F., Rosario L.A., Morffi J., et al. *Estrategias en las evaluaciones genotóxicas*. Retel 2009, 23(3): 23-40.
3. Loeb K.R. and Loeb L.A. *Enviromental Mutagens Effects*. Carcinogenesis 2000, 21: 379-85.
4. Ferrer M. *Estudio del potencial antimutagénico de Phyllanthus orbicularis*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Barcelona: España, 2002:1-91.
5. Arencibia D.F., Rosario L.A., and Vidal A. *The mice as ideal biomodel in the genotoxicity assays, Finlay Institute, Cuba*. Rev Salud Anim 2011, 33(1).
6. CCAC. Canadian Council on Animal Care. *Guidelines for the use of animals in Psychology*. In: Olfert E.D., Cross BM, McWilliam DVM, McWilliam AA (Eds.) Ottawa: Bradda Printing Services Inc, 1997:155-62.
7. Arruzazabala M..L, Mas R., and Molina V. *Effect of D-004, a lipid extract from the Cuban royal palm fruit on atypical prostate hyperplasia induced by phenylephrine in rats*. Drugs in R&D 2006, 7: 233-41.
8. Shayne C.G. *Animal Models in toxicology*. In: Published by Shayne C. Gad and Taylor & Francis Group. Toxicology: Chapter 2 and 3. The Mouse and Rats. 2nd ed. New York: (USA), LLC edition 2007, 24-162.
9. Mitchell A.D. *Product Safety Evaluation Handbook*. In: Marcel Dekker, Inc edition Gad S.C. Genetic Toxicology Testing. USA, 1999:167-8.





10. Wyrobek A.J. and Bruce W.R. *Chemical Mutagens*. In: United Kingdom edition published. Principles and Methods for their detection. 2nd ed (vol 2). England, 1978:135-6.
11. Speit G., Vasquez M., and Hartmann A. *The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity*. Mut Res 2009, 681(1): 3-12.
12. Collins A.R. *The Comet Assay for ADN Damage and Repair*. Principles. Mol. Biotech 2004, 26: 249-61.
13. Lee R. and Steinert S. *Use of the single gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals*. Mut. Res 2003, 544: 43-64.
14. Smith C.C., Adkins D.J., Martin E.A., et al. *Recommendations for design of the rat Comet assay*. Mutagenesis 2008, 23: 233-40.
15. Hayashi M., Tice R., Macgregor J.T., et al. *In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay*. Mutation Research 1993, 5: 120-34.
16. Arencibia D.F., Rosario L.A., Morffi J., et al. *Desarrollo y estandarización de la técnica en tres ensayos de genotoxicidad*. Retel 2009, 25(3): 22-38.
17. Kempina W.G. and Lamano-Carvalho T.L. *A method for estimating the concentration of spermatozoa in the rat caudal epididymidis*. Lab Anim 1998, 22: 154-6.
18. González J.E., Gámez R., Rodeiro I., et al. *Evaluación del efecto genotóxico del D-003 en ratas Sprague Dawley empleando la electroforesis alcalina de células individuales en gel (Ensayo Cometa)*. Revista CENIC 2004, 35(2): 125-7.
19. Gocke E., Bürgin H., and Müller L. *Literature review on the genotoxicity, reproductive toxicity, and carcinogenicity of ethyl methanesulfonate*. Toxicol Letters 2009, 190: 254-65.
20. Arencibia D.F. y Rosario L.A. *La rata Sprague Dawley como biomodelo en la inducción de micro-núcleos en células de la médula ósea por ciclofosfamida y bleomicina*. Retel 2010, 29(1): 1-15.
21. Amri H., Batt A., and Siest G. *Comparison of cytochrome P-450 content and activities in liver microsomes of seven species including man*. Xenobiotica 1986, 16: 351-8.
22. Jana N.R., Sarkar S., Yonemoto J., et al. *Strain differences in cytochrome P451A1 gene expression caused by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the rat liver: Role of the aryl hydrocarbon receptor and its nuclear translocator*. Biochem Biophys Res Commun 1998, 248: 554-8.
23. Arencibia D.F. and Rosario L.A. *Respuesta de Ratas SD a la administración de ciclofosfamida y bleomicina mediante el ensayo de aberraciones cromosómicas en médula ósea*. Retel 2010, 28(1): 1-14.
24. Rezvanfar M.A., Sadrkhanlou R.A., Ahmadi A., et al. *Protection of cyclophosphamide-induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics, and DNA damage by an herbal source; evidence for role of free-radical toxic stress*. Human & Exp. Toxicol 2008, 27: 901-10.
25. Verdier F., Barrow P.C., and Burge J. *Reproductive toxicity testing of vaccines*. Toxicology 2003, 185: 213-9.
26. Rodríguez M.D., Gámez R., and González J.E. *Lack of developmental toxicity of D-003: a mixture of long chain fatty acids in rats*. Food Chem Toxicol 2003, 41: 89-93.
27. Rodríguez M.D., Gonzalez J.E., and Aleman C. *Evaluation of the reproductive and developmental toxicity of the D-003, a mixture of long-chain fatty acids, in rats and rabbits*. Food Chem Toxicol 2004, 42(12): 1977-85.
28. Rodríguez M.D., González J.E., León F., et al. *Perinatal and postnatal study of D-003, a mixture of long-chain fatty acids, in rats*. J Med Food 2006, 9: 223-30.





# Artículos

**Tabla 1.** Comparación entre ratas Sprague Dawley, Lewis y Wistar de ambos sexos al utilizarse como biomodelos en el ensayo co-meta alcalino, según inducción de daño al ADN de leucocitos de sangre periférica.

Grupos	Sexo	Unidades Arbitrarias	Nivel 0	Nivel 1	Nivel 2 (% Nucleotidos)	Nivel 3	Nivel 4
Control	H	34,80 ± 10,24a	79,14 ± 4,32a	11,86 ± 5,02a	5,37 ± 3,10a	2,32 ± 1,01a	1,31 ± 1,00a
Negativo	M	33,46 ± 7,51a	80,10 ± 5,22a	11,23 ± 5,56a	5,00 ± 2,89a	2,45 ± 1,20a	1,22 ± 0,98a
Sustancia Vehículo 1	H	32,56 ± 10,20a	80,32 ± 7,83a	11,11 ± 4,28a	5,25 ± 2,99a	2,33 ± 1,73a	0,99 ± 0,34a
	M	35,03 ± 8,90a	78,21 ± 9,10a	13,19 ± 4,77a	4,98 ± 2,33a	2,60 ± 1,26a	1,02 ± 0,83a
Sustancia Vehículo 2	H	33,19 ± 10,31a	80,46 ± 6,59a	10,78 ± 5,11a	5,17 ± 3,15a	2,29 ± 1,51a	1,30 ± 0,99a
	M	33,44 ± 7,62a	79,75 ± 3,83a	12,19 ± 4,99a	4,96 ± 2,51a	2,07 ± 1,65a	1,28 ± 1,01a
Control	H	101,45 ± 13,28 <sup>a</sup>	35,56 ± 3,55 <sup>a</sup>	43,47 ± 3,44 <sup>a</sup>	10,31 ± 3,91 <sup>*</sup>	6,08 ± 2,80 <sup>*</sup>	4,78 ± 2,46 <sup>*</sup>
Positivo (CF) <sup>1</sup>	M	106,83 ± 14,11 <sup>a</sup>	32,76 ± 4,88 <sup>a</sup>	44,67 ± 4,77 <sup>a</sup>	10,56 ± 3,68 <sup>*</sup>	7,00 ± 2,00 <sup>*</sup>	5,01 ± 2,51 <sup>*</sup>
<b>Ratas Lewis de ambos sexos</b>							
Control	H	74,77 ± 13,50	56,21 ± 2,32	25,85 ± 3,10	8,81 ± 1,20	5,22 ± 1,52	3,91 ± 0,86
Negativo	M	69,99 ± 15,20	58,85 ± 1,89	23,98 ± 2,77	8,93 ± 2,00	4,81 ± 2,01	3,43 ± 0,60
Sustancia Vehículo 1	H	71,57 ± 14,30	57,12 ± 2,20	25,45 ± 3,22	9,02 ± 2,12	5,56 ± 0,96	2,85 ± 0,99
	M	72,03 ± 11,55	55,30 ± 2,82	28,49 ± 2,67	8,10 ± 1,92	5,10 ± 1,00	3,01 ± 0,51
Sustancia Vehículo 2	H	71,57 ± 12,69	54,80 ± 3,29	29,91 ± 2,09	7,52 ± 3,05	4,74 ± 2,62	3,10 ± 1,20
	M	69,86 ± 13,77	55,31 ± 3,11	29,56 ± 3,02	8,08 ± 2,99	4,10 ± 2,83	2,96 ± 1,33
Control	H	112,68 ± 22,29 <sup>*</sup>	27,10 ± 4,15 <sup>*</sup>	50,00 ± 5,14 <sup>*</sup>	11,00 ± 5,81 <sup>*</sup>	6,92 ± 3,60 <sup>*</sup>	4,98 ± 4,26 <sup>*</sup>
Positivo (CF) <sup>1</sup>	M	110,24 ± 21,73 <sup>*</sup>	26,76 ± 4,88 <sup>*</sup>	51,17 ± 5,22 <sup>*</sup>	11,10 ± 4,99 <sup>*</sup>	7,01 ± 3,10 <sup>*</sup>	3,96 ± 5,32 <sup>*</sup>
<b>Ratas Wistar de ambos sexos</b>							
Control	H	79,19 ± 9,62	55,11 ± 2,32	26,10 ± 2,80	7,99 ± 1,31	6,09 ± 1,12	4,71 ± 0,21
Negativo	M	73,23 ± 11,23	57,10 ± 2,20	24,92 ± 2,05	9,16 ± 1,55	5,29 ± 1,72	3,53 ± 0,23
Sustancia Vehículo 1	H	68,98 ± 17,13	57,85 ± 1,83	24,99 ± 4,10	9,77 ± 2,01	5,11 ± 1,23	2,28 ± 1,33
	M	68,19 ± 13,38	56,50 ± 1,12	29,10 ± 1,88	7,21 ± 2,10	4,09 ± 2,26	3,10 ± 0,13
Sustancia Vehículo 2	H	73,46 ± 10,36	55,77 ± 2,56	28,11 ± 3,29	6,85 ± 3,99	5,43 ± 2,07	3,84 ± 0,81
	M	69,56 ± 11,93	54,11 ± 4,21	30,86 ± 2,55	8,88 ± 2,01	3,66 ± 2,83	2,49 ± 2,20
Control	H	111,63 ± 21,18 <sup>*</sup>	26,77 ± 4,66 <sup>*</sup>	49,87 ± 5,90 <sup>*</sup>	11,90 ± 4,93 <sup>*</sup>	7,88 ± 2,40 <sup>*</sup>	3,58 ± 4,85 <sup>*</sup>
Positivo (CF) <sup>1</sup>	M	111,80 ± 22,11 <sup>*</sup>	27,23 ± 4,33 <sup>*</sup>	50,05 ± 5,88 <sup>*</sup>	10,52 ± 5,20 <sup>*</sup>	8,09 ± 2,66 <sup>*</sup>	4,11 ± 4,99 <sup>*</sup>

CF (Ciclofosfamida), <sup>1</sup>Administración por vía ip  
<sup>\*</sup>p<0.05 (Comparación contra el control negativo en la misma línea genética, test de U de Mann Whitney). <sup>a</sup>p<0.05 (Difiere al comparar entre líneas teniendo en cuenta la misma variable en el mismo grupo experimental, test de U de Mann Whitney).  
(X media; DE desviación estándar, para las dos series experimentales).



**Tabla 2.** Comparación teniendo en cuenta el número total de eritrocitos poli y normocromáticos, índice de citotoxicidad y porcentaje de EP con micronúcleos en médula ósea de ratas Sprague Dawley, Lewis y Wistar de ambos sexos

Grupo	Sexo	MN	EP/EN	MN-EP (%)
<b>Ratas Sprague Dawley de ambos sexos</b>				
Control negativo	H	32 <sup>a</sup>	1,19 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>a</sup>
	M	27 <sup>a</sup>	1,20 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,05 <sup>a</sup>
Sustancia vehículo 1	H	29 <sup>a</sup>	1,21 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,20 ± 0,02 <sup>a</sup>
	M	30 <sup>a</sup>	1,19 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,02 <sup>a</sup>
Sustancia vehículo 2	H	25 <sup>a</sup>	1,18 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,05 <sup>a</sup>
	M	22 <sup>a</sup>	1,18 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,06 <sup>a</sup>
Control positivo (CF) <sup>1</sup>	H	250 <sup>**a</sup>	0,89 ± 0,04 <sup>*a</sup>	1,74 ± 1,03 <sup>*a</sup>
	M	241 <sup>**a</sup>	0,90 ± 0,03 <sup>*a</sup>	1,68 ± 0,92 <sup>*a</sup>
<b>Ratas Lewis de ambos sexos</b>				
Control negativo	H	48	1,11 ± 0,02	0,33 ± 0,05
	M	47	1,09 ± 0,03	0,32 ± 0,06
Sustancia vehículo 1	H	49	1,12 ± 0,02	0,34 ± 0,06
	M	50	1,13 ± 0,02	0,34 ± 0,05
Sustancia vehículo 2	H	42	1,10 ± 0,03	0,29 ± 0,07
	M	44	1,13 ± 0,02	0,30 ± 0,07
Control positivo (CF) <sup>1</sup>	H	295 <sup>**</sup>	0,82 ± 0,02 <sup>*</sup>	2,03 ± 1,48 <sup>*</sup>
	M	291 <sup>**</sup>	0,81 ± 0,02 <sup>*</sup>	2,00 ± 1,08 <sup>*</sup>
<b>Ratas Wistar de ambos sexos</b>				
Control negativo	H	54	1,12 ± 0,03	0,37 ± 0,02
	M	49	1,14 ± 0,02	0,34 ± 0,04
Sustancia vehículo 1	H	50	1,10 ± 0,03	0,34 ± 0,05
	M	55	1,11 ± 0,03	0,38 ± 0,03
Sustancia vehículo 2	H	51	1,10 ± 0,03	0,35 ± 0,03
	M	46	1,12 ± 0,04	0,32 ± 0,05
Control positivo (CF) <sup>1</sup>	H	292 <sup>**</sup>	0,79 ± 0,03 <sup>*</sup>	2,01 ± 1,56 <sup>*</sup>
	M	298 <sup>**</sup>	0,80 ± 0,02 <sup>*</sup>	2,05 ± 1,16 <sup>*</sup>

CF (Ciclofosfamida). <sup>1</sup>Administración por vía ip. Determinaciones en 2 000 células/animal. \*p<0.05 (comparación con el control negativo en la misma línea genética, ANOVA). <sup>a</sup>p<0.05 (Difiere al comparar entre líneas teniendo en cuenta la misma variable en el mismo grupo experimental, ANOVA). (X media; DE desviación estándar, para las dos series experimentales). \*\*p<0.01 (comparación con el control negativo en la misma línea genética, Prueba no paramétrica de X<sup>2</sup>, para las dos series experimentales).





# Artículos

**Tabla 3.** Resultados de la comparación de la frecuencia espontánea e inducida de aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratas Sprague Dawley, Lewis y Wistar de ambos sexos.

Grupos	Sexo	IM (%) <sup>a</sup>	Células con Poliploidía <sup>b</sup>	Gaps <sup>b</sup>	# de Células con aberraciones <sup>b</sup>
<b>Ratas Sprague Dawley de ambos sexos</b>					
Control Negativo	H	4,81 ± 0,10c	1c	5c	18c
	M	4,93 ± 0,09c	2c	6c	17c
Ciclofosfamida (50 mg/kg, i.p)	H	3,40 ± 0,26*c	28**c	69**c	246**c
	M	3,58 ± 0,43*c	23**c	62**c	220**c
Sustancia Vehículo 1	H	4,97 ± 0,21c	3c	8c	19c
	M	5,12 ± 0,18c	2c	7c	18c
Sustancia Vehículo 2	H	5,19 ± 0,32c	1c	6c	20c
	M	5,29 ± 0,25c	3c	4c	23c
<b>Ratas Lewis de ambos sexos</b>					
Control Negativo	H	4,38 ± 0,11	7	16	50
	M	4,41 ± 0,10	10	17	52
Ciclofosfamida (50 mg/kg, i.p)	H	2,99 ± 0,11*	42**	90**	342**
	M	3,10 ± 0,13*	40**	96**	360**
Sustancia Vehículo 1	H	4,33 ± 0,15	13	19	51
	M	4,51 ± 0,09	16	20	55
Sustancia Vehículo 2	H	4,47 ± 0,16	19	18	57
	M	4,60 ± 0,08	24	20	60
<b>Ratas Wistar de ambos sexos</b>					
Control Negativo	H	4,32 ± 0,13	9	20	55
	M	4,37 ± 0,11	16	22	51
Ciclofosfamida (50 mg/kg, i.p)	H	2,93 ± 0,09*	48**	99**	339**
	M	3,02 ± 0,10*	45**	100**	354**
Sustancia Vehículo 1	H	4,26 ± 0,16	18	21	53
	M	4,40 ± 0,10	19	18	58
Sustancia Vehículo 2	H	4,42 ± 0,14	22	23	59
	M	4,55 ± 0,10	22	18	61

<sup>a</sup>X ± D.E. De un total de 10 000 células/grupo/serie para un total de 20 000 células evaluadas, \*p<0.05; ANOVA.

<sup>b</sup>\*\*p<0.01; prueba no paramétrica X<sup>2</sup> (comparación contra el control negativo para ambas pruebas, en la misma línea genética).

c=Comparación entre líneas genéticas teniendo en cuenta el análisis estadístico en las mismas variables.





**Tabla 4.** Comparación en la morfología de la cabeza del espermatozoide, % de espermatozoides con gota citoplasmática y concentración espermática en epidídimos de ratas machos Sprague Dawley, Lewis y Wistar.

Grupos	n	Normales	Anormales	% EGC	Concentración*(10 <sup>6</sup> ) células/ml
<b>Ratas Sprague Dawley</b>					
CN	20	460,4 ± 19,4 <b>a</b>	39,6 ± 10,4 <b>a</b>	7,5 ± 2,3 <b>a</b>	2,18 ± 0,5 <b>a</b>
SV1	20	460,6 ± 8,3 <b>a</b>	39,4 ± 8,3 <b>a</b>	6,4 ± 3,2 <b>a</b>	2,09 ± 0,3 <b>a</b>
SV2	20	455,3 ± 17,5 <b>a</b>	44,7 ± 13,5 <b>a</b>	8,9 ± 4,1 <b>a</b>	1,97 ± 0,2 <b>a</b>
CF <sup>a</sup>	20	408,0 ± 7,0* <b>a</b>	92,0 ± 7,0* <b>a</b>	43,2 ± 6,1* <b>a</b>	0,81 ± 0,3* <b>a</b>
<b>Ratas Lewis</b>					
CN	20	430,7 ± 9,2	69,3 ± 9,2	10,6 ± 6,1	1,81 ± 0,4
SV1	20	432,4 ± 7,8	67,6 ± 7,8	11,8 ± 5,9	1,90 ± 0,2
SV2	20	424,9 ± 8,1	75,1 ± 8,1	14,1 ± 7,6	1,86 ± 0,2
CF <sup>a</sup>	20	372,1 ± 6,6*	127,9 ± 6,6*	60,6 ± 8,2*	0,63 ± 0,3*
<b>Ratas Wistar</b>					
CN	20	428,6 ± 7,9	71,4 ± 7,9	11,7 ± 5,2	1,79 ± 0,3
SV1	20	433,9 ± 8,8	66,1 ± 8,8	12,3 ± 4,9	1,89 ± 0,3
SV2	20	425,1 ± 9,3	74,9 ± 9,3	14,5 ± 6,2	1,81 ± 0,2
CF <sup>a</sup>	20	369,2 ± 4,2*	130,8 ± 4,2*	62,1 ± 9,7*	0,60 ± 0,3*

(CN: Control negativo, SV1: Sustancia vehículo 1, SV2: Sustancia vehículo 2, CF: Ciclofosfamida). EGC: Espermatozoides con gota citoplasmática.

<sup>a</sup>Administración por vía ip, durante 5 días. Determinaciones en 500 células/animal. \*p<0.05 (comparación con el control negativo en la misma línea genética, ANOVA). **a**=p<0.05 (Difiere al comparar entre líneas teniendo en cuenta la misma variable en el mismo grupo experimental, ANOVA).

(**X** media; **DE** desviación estándar, para las dos series experimentales).





software para gestión  
de animalarios

nueva  
versión  
3.00

anibio hace que todas las piezas encajen

**Gestión del animalario**  
- Animales, jaulas, cruces,  
incidencias...



**Comunicación con  
investigadores**

- Consulta de animales  
y genotipado
- Petición de servicios
- Mensajería interna



**Gestión de pedidos**  
- Nuevos y existentes



**Comité Ético**  
- Gestión de proyectos  
- Gestión de procedimientos  
- Documentación

**Estadísticas e informes**

- Entrada/salida de animales
- Informes países UE



**ventajas**

- Software y soporte en varios idiomas
- Informes acordes a la legislación europea
- Explotación de datos
- Fiabilidad
- Flexibilidad
- Eficiencia

encuentra tu anibio



**Basic**

Gestión profesional  
de un animalario



**Advanced**

Funcionalidades Extra  
(Servicios, Gestión financiera, Acceso web, etc)



**PLAT**

Para complejas plataformas  
Institucionales con "N" animalarios

**A medida**

Software modular que permite  
añadir módulos a medida  
de tus necesidades



anibio@noraybio.com  
www.noraybio.com



**GRANJA  
RIERA**

Nuestra experiencia al servicio de la investigación

T. 676 972 641

F. 938 431 263

Apdo. Correos 41 / 08480 L'AMETLLA DEL VALLÈS (Barcelona)

info@granjariera.com



# Granja San Bernardo

M.D.L.

MINIMAL DISEASE LEVEL

LABORATORY RABBIT · Type: New zeeland white

MINIMAL DISEASE LEVEL= Total absence of all important rabbit disease germs.

Specific sanitary guarantees: ask our most recent guarantee tables.

CONEJO PARA LABORATORIO · Type: Neozelandés blanco

MINIMAL DISEASE LEVEL= Ausencia total de gérmenes patógenos importantes del conejo.

Garantías sanitarias específicas: solicite nuestro control de estado sanitario más reciente.



Granja San Bernardo S.L. - Tulebras · Navarra · España

Tlfno/Fax: 948 85 01 25

atencionalcliente@granjasanbernardo.com

[www.granjasanbernardo.com](http://www.granjasanbernardo.com)

Empresa certificada en:





**Antonia Taberero**  
**Susana Maqueda**  
**Mercè Recio**  
**Benjamín Santos**

**Gemma Guevara**  
**Luis Parra**  
**Antonio Guglietta**

*Centro de Investigación y Desarrollo Farmacéutico  
(CIDF) Ferrer Internacional S.A.*

## Canulación crónica de la arteria carótida en el ratón

### Introducción

La obtención seriada de muestras de sangre de roedores es una práctica rutinaria en estudios que se realizan durante el desarrollo preclínico de fármacos, principalmente en estudios de farmacocinética. La implantación de cánulas intravasculares que se exteriorizan a través de la piel permite el acceso al torrente circulatorio de manera permanente y facilita la extracción de múltiples muestras de sangre, minimizando el malestar causado a los animales durante la práctica de punciones repetidas y aplicación de otros métodos clásicos de extracción de sangre que suponen un estrés importante para el animal.

Actualmente, las ventajas de los modelos de animales canulados se han visto incrementadas con la aparición de sistemas automatizados de muestreo *in vivo*, ya que los catéteres implantados de forma crónica sirven para la conexión del animal al sistema de extracción automática. El proceso de muestreo automático supone un avance metodológico que mejora la calidad y la reproducibilidad de los resultados por varias razones:

- 1) Se realiza en animales conscientes con libertad de movimiento, lo que proporciona un modelo experimental más representativo de la fisiología del organismo.
- 2) Permite obtener suficientes muestras a diferentes tiempos para realizar curvas completas en un

mismo animal, lo que contribuye a una información farmacocinética de mayor calidad.

- 3) Reduce el número de animales requerido para los estudios.
- 4) Garantiza una buena estandarización de la técnica, a través de la programación de los tiempos de muestreo y los volúmenes de extracción, en comparación con las inevitables desviaciones de la técnica manual.
- 5) Hace posible la reutilización de animales en varios estudios tras un periodo de recuperación adecuado.

Estas técnicas han sido primeramente desarrolladas en roedores, tanto en rata como en ratón. Aunque su aplicación en el ratón es más complicada, debido a la dificultad de practicar una cirugía vascular en un animal de tamaño tan pequeño y conseguir una recuperación post-operatoria óptima, el esfuerzo en la implementación de la técnica en esta especie se justifica por la amplia variedad de modelos experimentales que se están obteniendo gracias a las técnicas de modificación genética, siendo una herramienta de estudio muy importante para la extrapolación en humanos.

El éxito de la intervención quirúrgica y el mantenimiento de la apertura de la vía implantada dependen de la ausencia de procesos infecciosos e inflamatorios





y otros factores que pueden obstruir el catéter, como la formación de trombos. Para conseguir este objetivo, el investigador debe estar correctamente entrenado, los medios ser adecuados y los procedimientos quirúrgicos y salas correctamente diseñados. No hay que olvidar el papel relevante de la fase post-operatoria y todos los cuidados que se puedan ofrecer desde el punto de vista del bienestar animal.

## Procedimiento

### Medicación pre-operatoria

Previamente a la intervención quirúrgica, a los animales se les administra una dosis única de un antiinflamatorio no esteroideo como el Metacam® (meloxicam: 1 mg/Kg) y un analgésico opiáceo, Buprex® (buprenorfina: 0.03 mg/Kg), por vía subcutánea.

### Inducción anestésica

Transcurridos unos 10 minutos tras la administración de la medicación preoperatoria, se anestesia al animal vía inhalatoria con isoflurano. Se introduce el animal en una cámara de inducción y se le administra una mezcla de isoflurano al 4% en oxígeno (0.6 l/ min) durante unos minutos hasta conseguir una anestesia profunda. El plano de anestesia se comprueba mediante la pérdida del reflejo palpebral y podal. Seguidamente se coloca el animal sobre una mesa de trabajo, manteniendo el hocico en una mascarilla a través de la cual se sigue suministrando el gas anestésico a una dosis adecuada para el mantenimiento de la anestesia (1- 2.5% de isoflurano en oxígeno 0.6- 0.8 l/min).

La anestesia inhalatoria es recomendable en esta especie por la rápida recuperación del animal. Además, a diferencia de otros fármacos anestésicos, induce una escasa vasoconstricción, lo que facilita el procedimiento de canulación.

### Preparación del animal

El animal anestesiado se coloca sobre un plano quirúrgico aséptico, en posición de decúbito supino (Figura 1). Para evitar la hipotermia causada por la anestesia,

se sitúa al animal sobre una manta térmica y se verifica la temperatura corporal regularmente mediante una sonda rectal.



**Figura 1:** Colocación del animal en el plano quirúrgico bajo anestesia inhalatoria con isoflurano

Se aplica un lubricante ocular como la vaselina o glicerina estéril, recubriendo toda la superficie de cada ojo para evitar la sequedad provocada por la anestesia.

Con una maquinilla eléctrica se rasura toda la zona anterior del cuello, en la que se realizará la intervención quirúrgica. También se rasura la zona interescapular, en la cual se exteriorizará el catéter implantado. Las zonas rasuradas se desinfectan con una mezcla de povidona yodada y alcohol 70° (50/50, v/v).

### Disección de la arteria carótida

El material quirúrgico que se utiliza debe estar esterilizado, preferentemente en autoclave, y mantenerse en condiciones asépticas durante el procedimiento utilizando una solución alcohólica.





## Técnicas

Con la ayuda de unas tijeras pequeñas, se practica un pequeño corte longitudinal en el centro de la zona anterior del cuello del ratón, en dirección al abdomen. Se retira suavemente la piel del corte, se localizan las glándulas parótidas y la línea de separación de ambas. Siguiendo esta última con las tijeras, se practica un pequeño corte para separarlas.

A continuación se separa el músculo esternomastoideo, en torno a la tráquea, usando unas pinzas finas (Moria Iris forceps, Fine Science Tools refs.11370-31,11370-32). Visualizaremos la arteria carótida que discurre lateralmente junto a la tráquea, adyacente al nervio vago. La arteria es fácil de identificar por su contenido en sangre y porque se suele detectar la pulsación acorde con el latido cardiaco.

En el espacio entre la musculatura y la arteria se inserta la punta de una pinza, de forma que con un pequeño giro hacia el exterior se puedan recoger la arteria y el nervio. Luego la arteria se separa cuidadosamente del nervio, introduciendo una pinza entre ambos, y se limpia eliminando el tejido conectivo adherido a la pared vascular. Esta manipulación se realiza con extremo cuidado para evitar dañar el nervio o provocar una rotura de la arteria. Periódicamente, y hasta el final de la intervención, la zona quirúrgica se humedecerá con unas gotas de suero salino estéril para hidratar los tejidos.

Una vez aislada la carótida con las pinzas, se desliza por debajo de ella un hilo de seda 5/0 doblado por la mitad, también humedecido con solución salina. Una vez pasado el hilo, se corta en dos mitades: una de ellas se desliza en posición craneal y se anuda para cortar el flujo de sangre y la otra mitad se sitúa en posición caudal y con ella se hace también un nudo que se deja sin cerrar (Figura 2).



**Figura 2:** Imagen de la arteria carótida aislada

### Colocación del catéter intravascular

En el mercado existen diversos tipos de catéteres de diferentes materiales que pueden ser utilizados. Nosotros utilizamos un catéter específico para la conexión al sistema Culex® Automated Blood Sampler (Bioanalytical Systems Inc., ref. CX 2052-S) para la extracción automatizada de muestras de sangre. Es un catéter estéril con un volumen interno de 14.5 µl que se suministra con una aguja adaptada. Cerca del extremo de inserción vascular presenta un tope del mismo material y en el extremo





opuesto presenta dos bolitas coloreadas y un cierre de plástico. En el momento de su utilización, se retira el cierre de plástico, conservándolo a parte, y se conecta a una jeringa utilizando la aguja adaptada. A continuación el catéter se ceba con suero salino estéril heparinizado (1.6 UI heparina/ ml).

Para realizar la canulación utilizamos un microscopio estereoscópico sin lente ocular que proporciona una imagen aumentada de hasta 20X, Mantis® Elite Compact (Vision Engineering). Además ofrece una imagen en 3 dimensiones de muy buena calidad y permite trabajar con comodidad, reduciendo la fatiga provocada por los microscopios tradicionales.

Colocamos una espátula por debajo de la arteria y tensamos el hilo distal con ayuda de unos fórceps hemostáticos. Con el vaso así expuesto, practicamos una incisión en el centro de la pared vascular con unas microtijeras (Vannas spring scissors, 3 mm hoja, Fine Science Tools, ref.15000-00), procurando mantener un ángulo de 45° con la arteria. Al perforar la pared, aparecerá una gota de sangre que nos indicará el orificio realizado. Para evitar la pérdida de sangre se mantiene siempre el hilo distal pensionado y si es necesario, se limpia la zona con un bastoncillo de algodón impregnado con solución salina.

En la incisión practicada introducimos la punta de unas pinzas finas curvas. Levantamos ligeramente la punta de las pinzas para abrir la luz del vaso e introducimos el extremo del catéter deslizando bajo las pinzas, haciéndolo avanzar hasta el tope (Figura 3A). Si el catéter está bien colocado, se observará que se llena de sangre rápidamente. El flujo de sangre se puede regular con la jeringuilla rellena de suero heparinizado. Seguidamente se fija el catéter anudando el hilo a su alrededor de manera firme pero sin cortar el flujo de sangre (Figura 3B). Este primer nudo se realiza por delante del tope del catéter y luego se realiza un segundo nudo por detrás, asegurando la sujeción a la arteria.



**Figura 3:** A) Introducción del catéter en el lumen vascular. B) Fijación del catéter en la arteria canulada

### Exteriorización del catéter

Se da la vuelta al animal y se practica un pequeño corte en la zona interescapular. Con ayuda de un clip o pinza hemostática se pinza el catéter por encima de la bolita coloreada. Se retira la jeringa y se introduce en el corte realizado en la zona interescapular, deslizándola subcutáneamente hasta la zona de la cirugía. La jeringa se conecta de nuevo al catéter, se retira la pinza, y se arrastra subcutáneamente hacia el exterior.

Una vez exteriorizado el catéter, se rellena con una solución anticoagulante de mantenimiento (lock) de glicerol con heparina sódica (350 UI/ ml). El volumen administrado es el equivalente al volumen muerto del catéter (14.5  $\mu$ l). Finalmente, se retira definitivamente la jeringa y se coloca el cierre de plástico original.

### Finalización del procedimiento quirúrgico

En la zona de la intervención, el catéter se fija con seda trenzada 5/0 estéril mediante un punto de sutura en el paquete muscular del cuello. Antes de cerrar la



# Técnicas

herida, se aplican unas gotas de lidocaína para favorecer la vasodilatación y disminuir la sensibilidad en la zona. La incisión de la piel se cose con puntos sueltos, de manera que al hacer el primer punto se volverá a fijar el catéter. La zona interescapular se cierra con un par de puntos dejando la última bolita coloreada justo por encima de la piel (Figura 4A). En las suturas de la piel aplicamos también unas gotas de lidocaína.



**Figura 4:** A) Exteriorización del catéter implantado en la zona interescapular. B) Ratón canulado; primeros minutos de recuperación post-operatoria

### Recuperación post-operatoria

Una vez finalizada la operación (Figura 4B), se administra al animal 1 ml de suero salino estéril por vía subcutánea para compensar la pérdida de fluidos durante la cirugía y la deshidratación causada por la anestesia.

El animal operado se acomoda en una cubeta individualizada con agua y comida *ad libitum*. La recuperación post-operatoria tiene lugar en una unidad de protección animal (UPA) a temperatura controlada entre 25-27 °C, siendo supervisada por el responsable de bienestar animal del centro.

Para facilitar la recuperación del animal le suministramos hidrogel como alimento, que ayuda a mantener

hidratado el animal. En las primeras horas post-operatorias dejamos caer en la cubeta pequeños pedazos de pienso humedecido con agua para favorecer la masticación. A las 24h de la intervención se administra una nueva dosis de Metacam® (meloxicam: 1 mg/Kg).

La extracción de muestras de sangre se puede realizar tras la recuperación post-operatoria, en general, y si no hay complicaciones, al cabo de 2- 3 días después de la intervención.

### Mantenimiento de la funcionalidad del catéter intra-vascular

El mantenimiento de los catéteres consiste en renovar de forma periódica la solución lock para evitar la formación de coágulos que puedan obstruir la vía y mantenerla abierta hasta el momento de realizar las extracciones de sangre. En este caso concreto, al tratarse de una arteria con una presión sanguínea importante, la renovación se puede espaciar alrededor de 3-4 días.

En el ratón, debido a la dificultad de manipulación, se requiere realizar la operación bajo anestesia con isoflurano. Para ello, se retira el cierre de plástico del catéter y se aspira con una jeringa hasta observar que fluye la sangre. A continuación, se lava el catéter con unos microlitros de suero salino estéril y se rellena con solución lock fresca. Se coloca de nuevo el cierre del catéter y se devuelve el animal a su cubeta.



**Figura 5:**

Imagen de un ratón canulado en el sistema Culex de extracción automatizada de muestras de sangre

### Agradecimientos

A Natasha Nikolaidis y Robyn Guinn por su ayuda en la puesta a punto de la técnica.



Quando la trazabilidad es una necesidad **SOURALIT** es su garantía

# SOURALIT

Madera no resinosa

Minima presencia de polvo

Gran capacidad de absorción

Presentaciones irradiadas envasadas al vacío

Análisis microbiológicos y físico-químicos de los lotes entregados





# Presión Positiva

**DolorsBalsa**

Drug Development Manager, nLife Therapeutics

## De la idea a la píldora: el descubrimiento de nuevos fármacos

### Introducción

Un fármaco es una sustancia (química o biológica, sintética o no sintética) utilizada en el diagnóstico, tratamiento y prevención de una enfermedad reconocida por las Autoridades Regulatorias del Medicamento. El proceso de descubrimiento y desarrollo de una medicina es un proceso largo que puede durar entre 10-15 años. Además, es un proceso caro: el coste medio para desarrollar un fármaco de prescripción ronda los 900 millones USD. Se trata de un negocio de alto riesgo por su elevada tasa de fracaso: típicamente, sólo un compuesto de cada mil sintetizados llega hasta la primera administración en humanos, y de cada diez que entran en fases clínicas, sólo uno llega al mercado. Se ha demostrado que la tasa media de éxito para la aprobación de un fármaco para todas las áreas terapéuticas es de un 11%. Sin embargo, esta tasa de éxito varía entre áreas terapéuticas, yendo desde el 20% para fármacos cardiovasculares, hasta sólo el 5% para oncológicos y compuestos del sistema nervioso central.

Una medicina no sólo debe ser eficaz y segura, sino que su eficacia debe estar demostrada en los diferentes grupos raciales y étnicos, así como en los diferentes grupos de edades. Cada fármaco debe pasar una revisión regulatoria, en lo que es actualmente la industria más regulada del mundo. Y una vez aprobado por las Autoridades Regulatorias del Medicamento, el

producto debe llegar a los mercados globales a través de los sistemas de salud y de distribución.

Existe una impresión generalizada de que la industria farmacéutica sólo descubre el 27% de los nuevos fármacos, cuando la realidad demuestra que el 90% de las nuevas medicinas son descubiertas por las empresas que realizan I+D.

### Proceso de desarrollo de un fármaco

El desarrollo de un fármaco se inicia con la selección del área terapéutica a partir de la necesidad médica y la prevalencia de la enfermedad. El proceso de desarrollo de un nuevo fármaco se divide en varias fases (Figura 1):

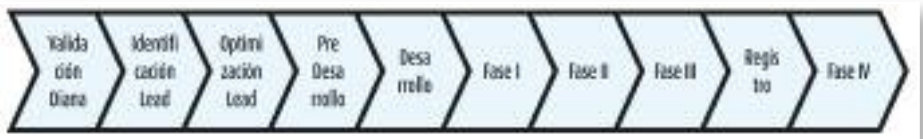


Figura 1: Fases de descubrimiento y desarrollo de un fármaco

### Identificación y validación de la diana

El proceso de descubrimiento de nuevos fármacos comienza con la identificación de la diana molecular. Los científicos necesitan encontrar una proteína (p.ej. un receptor) o un gen asociado a una enfermedad con el que el fármaco pueda interactuar y producir el cambio deseado en las células enfermas. No todas las dianas son igualmente capaces de afectar el curso de una enfermedad. Durante la validación de la diana, se ensaya la asociación de la diana con una enfermedad es-





pecífica y su capacidad de regular procesos biológicos en el organismo.

### Identificación del 'Lead'

Las estructuras químicas de partida pueden ser sustancias naturales de plantas, animales o humanas, pero normalmente provienen de la síntesis química, y están dirigidas a interactuar con las estructuras de los receptores o enzimas conocidos y regular su actividad. Durante esta etapa, los químicos orgánicos colaboran con los 'modelizadores moleculares' y bioinformáticos para diseñar familias químicas con potencial de unión a esa diana, ensayando la capacidad de grandes bibliotecas químicas para modificar la diana mediante *High-Throughput Screening* (HTS) o 'cribado de alto rendimiento' robótico en ensayos biológicos *in vitro*. Otro método de identificación es el 'cribado virtual' (o cribado *in silico*), que se define como la selección de compuestos evaluando sus propiedades en modelos informáticos. La búsqueda de una molécula - el Lead - que pueda interactuar con la diana implica el cribado de miles de compuestos de las librerías químicas, pero sólo un 1% es considerado viable y calificado como Lead. Así, a partir de millones de compuestos, sólo unas pocas moléculas muestran el perfil biológico básico deseado.

### Optimización del 'Lead'

El objetivo de la optimización del 'Lead' es mejorar las propiedades de los 'Leads' identificados en la etapa previa, y seleccionar aquellos compuestos con el mayor potencial para ser desarrollados a medicinas efectivas y seguras. Lo ideal es encontrar una molécula que sólo interfiera con la diana escogida, pero no con otras dianas relacionadas para evitar efectos indeseados. A esto se le llama selectividad. Los químicos sintetizan nuevas moléculas derivadas del 'lead', cuyas propiedades farmacológicas y farmacodinámicas se ensayan en sistemas celulares *in vitro* y en modelos *in vivo*.

### PreDesarrollo

En esta etapa, los estudios toxicológicos, analíticos y farmacocinéticos preliminares responden a preguntas tales como: cuáles son las características físico-quí-

micas de la sustancia, el comportamiento metabólico (cómo se metaboliza el fármaco en el organismo), la biodisponibilidad (durante cuánto tiempo permanece el efecto) y la seguridad (qué potenciales efectos secundarios puede tener). De esta forma, se conoce el perfil preliminar de seguridad del compuesto. Una vez se ha conseguido un mínimo del criterio de selección, el compuesto se mueve de 'lead' a 'candidato', y se permite su progresión para la clínica. En algún momento entre esta etapa y la anterior, se suele tomar la decisión de patentar el compuesto o la familia química. Una patente temprana mitiga el riesgo contra los potenciales competidores, pero el retrasar la patente permite la introducción de datos adicionales que fortalecen la aplicación y prolonga la fecha de expiración de la patente, lo que permite mayor vida para la venta del producto, una vez en el mercado.

### Desarrollo Preclínico

Durante esta etapa, los ensayos de laboratorio se dirigen hacia cuestiones fundamentales del fármaco investigado y requeridas por las Autoridades Regulatorias del Medicamento.

- La tolerancia y efectos secundarios potenciales a través de los estudios toxicológicos requeridos (incluyendo genotoxicidad, seguridad farmacológica, toxicología tras dosis múltiples y estudios de toxicocinética), que permiten acceder a la primera administración en humanos. Para solicitar la autorización del producto también la toxicología reproductiva y la carcinogénesis pueden ser un prerrequisito.
- La formulación farmacéutica óptima para el tipo de producto y la indicación terapéutica, y el proceso de escalado y fabricación para los estudios clínicos.

Durante estas fases, los ensayos con animales de experimentación son necesarios para determinar la eficacia, seguridad, farmacocinética y metabolismo de la molécula, y así poder extrapolar estos parámetros a humanos, antes del primer estudio clínico.



# Presión Positiva

## Desarrollo Clínico. Fase I

La Fase I empieza con la primera administración del nuevo producto medicinal en humanos. Habitualmente, esta fase implica voluntarios sanos, con la excepción de los citotóxicos, que pueden ser ensayados directamente en pacientes. En los ensayos de Fase I, los médicos trabajan con voluntarios sanos para investigar la farmacodinamia (efecto del fármaco en el organismo, p.ej. frecuencia cardiaca, presión sanguínea, etc.), la farmacocinética (efecto del organismo en el fármaco, p.ej. su absorción, distribución, metabolismo y excreción) y la tolerancia, para encontrar la dosis preliminar óptima, con la máxima tolerabilidad y seguridad a corto plazo. Estos estudios requieren la aprobación de las Agencias Regulatorias del Medicamento y de los Comités Éticos. Los estudios de Fase I habitualmente comienzan con dosis únicas subfarmacológicas que se escalan gradualmente, seguidas de estudios de dosis múltiples. Los estudios adicionales de Fase I se llevan a cabo durante la Fase II y III, incluyendo el efecto de la comida en la absorción del compuesto, y las influencias genéticas y de la edad.

*Papel de los Biomarcadores/Medicina Translacional:* los biomarcadores son medidas cuantitativas de efectos biológicos que proporcionan información vinculando el mecanismo de acción y la eficacia clínica. Existen varios tipos de biomarcadores que se trasladan de preclínica a humanos: (1) marcadores de enfermedad (p.ej. proteinuria), (2) de actividad farmacológica (inhibición de enzima-convertidor de la angiotensina en plasma), (3) marcadores surrogados de eficacia (p.ej. presión sanguínea), (4) de toxicidad (p.ej. niveles altos de transaminasas en plasma). La utilización adecuada de los biomarcadores en estudios clínicos resulta en la comprobación temprana de la eficacia, o incluso, la falta de eficacia, lo que permite tomar decisiones sobre la progresión del compuesto en el momento adecuado.

## Desarrollo Clínico. Fase II

En esta fase se establece la eficacia y la seguridad

en la indicación principal en unos pocos cientos de pacientes que sufren la enfermedad, tratándolos durante unas semanas o pocos meses. A esta fase también se la llama 'Prueba de Concepto' (PoC, *Proof of Concept*). Además, en esta fase se suele determinar la dosis final. Está dividida en Fase IIa y IIb. En la Fase IIa (Prueba de Concepto) se ensaya el fármaco en una cohorte pequeña (12-100) de pacientes. En la Fase IIb se ensayan diferentes niveles de dosis en la población diana para definir la dosis mínima efectiva y no-efectiva, y así poder decidir la dosis óptima para la siguiente fase.

## Desarrollo Clínico. Fase III

Esta etapa final de los ensayos clínicos confirma y refina la seguridad y eficacia en poblaciones segmentadas de pacientes bajo tratamientos largos y apropiados para la indicación. En esta fase pueden participar varios miles de pacientes, dependiendo de la indicación, por lo que se crean bases de datos para evaluar estadísticamente el perfil de eficacia y seguridad, y así poder establecer claramente el potencial riesgo-beneficio del fármaco. En algunos casos, se suele introducir en los estudios un brazo con el comparador, para demostrar no-inferioridad o superioridad respecto a la terapia estándar. La eficacia se puede establecer tanto demostrando superioridad respecto al placebo (en los estudios controlados por placebo), como mostrando superioridad respecto a un tratamiento activo-control. Esta es la última fase del desarrollo, previo al registro, y servirá para confirmar las dosis clínicas, frecuencia y duración de la administración para su aprobación por las Autoridades Regulatorias

## Registro

Tras obtener resultados positivos en los estudios clínicos, empieza un periodo de recopilación de todos los datos generados con el producto para someterlos a las Autoridades Regulatorias: *New Drug Application* (NDA, en el caso de la FDA - *Food and Drug Administration*), *Marketing Authorisation Application* (MAA, en el caso de la EMA - *European Medicines Agency*). Las Autoridades revisan cantidades sustanciales de datos y emi-





ten un juicio sobre si el fármaco debe o no entrar en el mercado. En algunos casos, dichos expertos puede requerir estudios adicionales a los promotores. Simultáneamente, la compañía tiene que presentar los planes para detectar, evaluar e informar de posibles futuros efectos adversos del futuro fármaco.

#### **Fase IV. En el Mercado**

Una vez el producto ha sido aprobado, se caracteriza más su efecto en subgrupos de pacientes especiales y en el contexto de un entorno terapéutico de polimedición, después que haya sido aprobado. La Farmacovigilancia es el término utilizado en Europa para definir la evaluación continua de la seguridad post-comercialización. Es un requerimiento que deben cumplir todas las empresas con un producto en el mercado. Los efectos nocivos descubiertos durante esta fase pueden conducir a la retirada del mercado de la medicina, como fue el caso de rofecoxib (Vioxx) y cerivastatina (Lipobay). Estos estudios suelen ser extremadamente grandes (p.ej. 30.000 pacientes) y pueden identificar incluso reacciones adversas raras. Durante esta fase también puede ocurrir que la medicación se apruebe para indicaciones adicionales.

#### **Las nuevas tecnologías y la gestión del conocimiento, herramientas clave**

A pesar de los avances en genética, biología molecular y celular, química e ingeniería proteica, en los últimos años se ha observado un incremento en los costes de desarrollo, pocas aprobaciones de nuevos fármacos, y algunas retiradas del mercado de fármacos muy perfilados. La investigación de la industria farmacéutica es un sector en el que se busca muy activamente la implementación de nuevas tecnologías (robótica, omics, técnicas de imagen *in vivo*, etc), con el objetivo de incrementar la productividad, eficiencia y las posibilidades de éxito del proceso, así como de proporcionar cuanto antes predicciones mejoradas de la potencial eficacia y seguridad del fármaco en humanos.

Por otro lado, estas nuevas tecnologías experimentales generan una cantidad ingente de datos de muy diversa índole. Por eso, es necesaria una gestión multidisciplinar y específica de la información (*Data Management*), que proporcione un servicio eficaz y con elevados niveles de seguridad.

#### **Estándares de calidad de un trabajo multidisciplinar**

Como se ha comentado anteriormente, este sector es el más regulado y auditado de la sociedad. Teniendo en cuenta que el producto final tiene como destino su administración a humanos, todos los datos generados sobre él deben ser de la más alta calidad. Para ello, todas las actividades se llevan a cabo bajo una serie de normas o guías estándares de calidad, y son revisadas y auditadas por las autoridades pertinentes. Un ejemplo es el ensayo en animales de experimentación, cuya utilización está requerida y muy regulada por las autoridades, y gestionada por los Comités Éticos de Experimentación Animal. En general, en las fases tempranas del descubrimiento se están implementando cada vez más las Buenas Prácticas Científicas (GSP, *Good Scientific Practices*), que aseguran la credibilidad, robustez y trazabilidad de los datos. Los estudios preclínicos se llevan a cabo de acuerdo a las guías de Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP, *Good Laboratory Practices*), que aseguran la calidad de los resultados. Los estudios clínicos se realizan bajo Buenas Prácticas Clínicas (GCP, *Good Clinical Practices*) que son las guías de calidad y seguridad requeridas internacionalmente para el diseño, dirección y ejecución de estudios en humanos, y los esenciales para asegurar los derechos y seguridad de los individuos implicados en el estudio. La fabricación del fármaco se lleva a cabo de acuerdo a las Buenas Prácticas de Fabricación (GMP, *Good Manufacturing Practices*), que dictan los estándares de fabricación y control de calidad del producto farmacéutico. Estos estándares están sujetos a inspección por parte de las autoridades regulatorias del medicamento.





# Presión Positiva

Todo este proceso involucra a un gran grupo de profesionales que incluye, entre otros, modelizadores moleculares, bioinformáticos, químicos, bioquímicos, biólogos moleculares y celulares, farmacólogos, toxicólogos, farmacocinéticos, galénicos, analistas químicos, clínicos, bioestadísticos, gestores de proyecto, datos y documentación, agentes de patentes, técnicos de garantía de calidad, ... trabajando conjuntamente en equipos multidisciplinares.

## Conclusiones

El desarrollo de un fármaco es un proceso largo, caro y muy regulado, que requiere pasión, creatividad y el trabajo colaborativo de profesionales con gran experiencia de diferentes ámbitos. Es un área en donde los riesgos de fracaso son muy elevados, pero es vital continuar la investigación farmacéutica si queremos disfrutar de los beneficios de la mejora de la salud de los pacientes a largo plazo.

## Bibliografía

- Kaitin K.I. *Deconstructing the Drug Development Process: The New Face of Innovation*. Clin Pharmacol Therap 2010, 87(3): 356-61.
- Kola I. and Landis J. *Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates?* Nat Rev Drug Discov 2004, 3: 711-5.
- Rester U. *From virtuality to reality – virtual screening in lead discovery and lead optimization: a medicinal chemistry perspective*. Curr Opin Drug Discov Devel 2008, 11: 559-68.
- Tamimi N.A.A. and Ellis P. *Drug Development: from concept to marketing*. Nephron Clin Pract 2009, 113: 125-31.



La democracia de nuestra automatización:  
el tamaño no importa.



Tecniplast e IWT se proponen hacer tu trabajo más fácil  
y menos costoso con soluciones altamente automatizadas,  
bajo la bandera "Automatización para Todos."

- **Modular** para poder adaptarse a cualquier tamaño de animalario
- **Flexible** para adaptarse a múltiples tareas
- **Ergonomía** en el centro de atención
- **Rentable** con un documentado y rápido retorno de la inversión
- Basado en la última **tecnología de vanguardia**





## ¿Y tú qué Opinas?

**ESTA SECCIÓN TIENE COMO OBJETIVO DESCRIBIR CASOS CLÍNICOS O PRÁCTICOS  
"INTERACTUANDO" CON EL LECTOR.**

**TODOS LOS SOCIOS ESTÁN INVITADOS A PARTICIPAR APORTANDO SUS CASOS**

**Juan Ramos Blasco**

**CONTACTO: JOSÉ LUIS MARTÍN BARRASA; [jlbarrasa@gmail.com](mailto:jlbarrasa@gmail.com)**

**Juan Martín Caballero**

*Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona-PRBB.*

# Dilatación abdominal en peces, Zebra fish (*Danio rerio*)

El uso de zebrafish como modelo de investigación biomédica está cobrando un gran auge en los últimos años por una serie de características que lo hacen ideal, y entre las que destaca el alto grado de prolificidad de este ciprínido, que alcanza la madurez sexual a partir de los 3 meses aproximadamente. El *Danio rerio* es un pez de agua dulce, típico del sureste del Himalaya, con un ciclo de reproducción continua (aunque puede presentar picos estacionales), que permite obtener puestas todo el año de manera programada y seriada, lo que le hace ideal para los estudios de toxicidad. Presenta un marcado dimorfismo sexual que será evidente a partir de los 3 meses, aunque su determinación sexual no tiene un carácter genético. En nuestras instalaciones, detectamos algunos peces con una gran dilatación abdominal que en ocasiones les

impide una natación eficaz, presentado incluso dificultades respiratorias.

**¿Y tú qué opinas?**

**¿Cuál es tu diagnóstico?**

**¿Qué tratamiento y medidas de prevención emplearías?**

**SOLUCIÓN:**

La hembra de zebrafish es capaz de poner unos 200 huevos cada semana aproximadamente y que serán fecundados externamente. Estos huevos son de gran tamaño y traslúcidos, lo que facilita la microinyección de los mismos y los estudios embriológicos.

El éxito reproductor de estos peces depende de distintos factores como la calidad genética, la nutrición (rica en proteínas y ácidos grasos esenciales) y un conjunto de factores estimuladores que emulan las condiciones naturales de su ecosistema, como pueden ser la estimulación visual, olfatoria, gradientes térmicos y de profundidad, coloración y tipo de sustrato... Las puestas o *freeza* se realizan al amanecer y para ello se requiere alcanzar un umbral de estimulación que permita desencadenar el cortejo y la oviposición final.





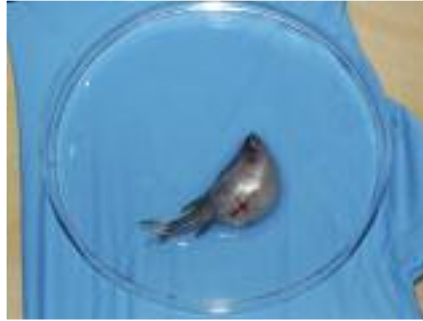
En casos como el que nos ocupa, en los que no se pueda alcanzar el umbral de excitación que permita la oviposición o por el bloqueo mecánico de la cloaca, se puede producir un proceso de sobremaduración de los oocitos que endurecerán su corión (cubierta externa del huevo) evitando futuras oviposiciones. Los oocitos seguirán madurando hasta la fase V (última fase de maduración), pero al no poder salir al exterior se irán acumulando en la cavidad celómica y protruyendo la misma; lo que acaba desencadenando problemas en la natación, respiración e incluso deformidades del raquis. En el interior de la cavidad celómica se podrán observar distintos estadios de desarrollo de oocitos. A su vez, estos procesos van acompañados de procesos inflamatorios, eritema, especialmente a nivel de la cloaca, y fibroplasia del ovario. Si el problema permanece se empezarán a dar procesos autolíticos de los huevos (degenerándolos en parte) mientras que el animal puede sufrir caquexia, acompañada de la protusión y eritema del poro urogenital e incluso la aparición de úlceras laterales debido a la respuesta inflamatoria. Así mismo, la fibroplasia puede acabar provocando un fibrosarcoma o fibromas.

La existencia de la respuesta inflamatoria y de la fibroplasia ovárica en zebrafish también se puede asociar a problemas derivados del manejo de las hembras, cuando se les somete a presión abdominal para forzar la expulsión de los huevos (masaje abdominal). La prevalencia de esta patología es menor en aquellas poblaciones en las que las puestas se obtienen de manera natural. En los casos observados, la presencia de bloqueos ováricos se asocia principalmente a problemas en la sincronización de las

puestas; es decir, que las hembras grávidas, con huevos listos para salir, no tuvieron un estímulo de oviposición adecuado (para realizar la oviposición, el zebrafish debe alcanzar un umbral de excitación mínimo que desencadena el ritual de cortejo, gracias a la acumulación de distintos estímulos como por ejemplo: el amanecer, calidad de la dieta, gradientes térmicos y de profundidad, estimulación visual, dilución de los metabolitos presentes en el agua... ). Algunos autores (como M. Kent) afirman que la prevalencia de la patología puede aumentar por la presencia de algunos patógenos, como por ejemplo el *Mycobacterium spp.*, que requerirá siempre de un diagnóstico diferencial.

En el caso que no esté muy avanzado el proceso de sobremaduración del oocito, es recomendable estimular lo máximo posible (mediante la acumulación de los distintos estímulos anteriormente enunciados) y de manera repetida a las hembras, por si pudieran producir la oviposición de manera natural. En caso contrario, se puede intentar un masaje abdominal suave con el pez anestesiado, e incluso el uso de oxitocina que permite la distensión de la cloaca y la oviposición de estos oocitos sobremaduros y degenerados. La gestión de las poblaciones de estos animales en los sistemas de recirculación es de vital importancia, ya que nos permitirá disminuir la

prevalencia de la sobremaduración mediante el correcto manejo de los reproductores para sobrepasar el umbral de oviposición a la hora de realizar los cruces. Para ello, podemos por ejemplo mantener los sexos estabulados conjuntamente, o realizar cruces de manera rutinaria evitando la acumulación de los oocitos en la cavidad celómica.



The ISO-certified product family



**Representante en España**

Maria Carmen Viso

Tel.: (+34) 655763828

Maria-Carmen.viso@ehretlab.com

**Bio.A.S.® CAGE**  
(as per appendix A)

**Bio.A.S.® RACK**

**Bio.A.S.® VENT**

**Bio.A.S.® SAFE**

**Bio.A.S.® CHANGE**

**Bio.A.S.® UNI-PROTECT**



**EHRET LIFE SCIENCE SOLUTIONS**

[www.ehretlab.com](http://www.ehretlab.com)

Fabrikstraße 2  
78012 Sinsheim  
Tel. +49 7141 5088-0  
Fax +49 7141 47970  
info@ehretlab.com

Hauptstraße 10A  
92269 Weihe  
16341 Weiditz  
Tel. +49 35056 81101  
Fax +49 35056 81312  
info@ehretlab.com

Zingsthauserstraße 8  
A-3100 Tulln  
Tel. +43 2272 84218  
Fax +43 2272 84219  
office@ehretlab.at  
[www.ehretlab.at](http://www.ehretlab.at)

## Sistemas de enjaulado para investigación científica



Su colaborador para  
el óptimo alojamiento  
de sus animales

-  • fiable y de confianza  
• orientado al cliente  
• innovador  
• competente



### **E. BECKER & CO. GMBH**

Hermannstr. 6 • D-44579 Castrop Rauxel • Tel.: +49 (0) 23 05 / 97 30 40  
Fax: +49 (0) 23 05 / 97 30 444 • email: [info@ebeco.de](mailto:info@ebeco.de) • [www.ebeco-vth.de](http://www.ebeco-vth.de)

Representante en España: JOSÉ A. ALONSO

C/ Templeque 56 • 28024 MADRID • Tel/Fax: 917 112 553 • Móvil: 629 805 959 • email: [ja.alonsov@gmail.com](mailto:ja.alonsov@gmail.com)

Una solución global para el equipamiento en Animalarios,  
Centros I+D, Salas Estériles / Blancas

Uestuario Técnico  
Lavandería Clase 100  
Alfombras Control Acceso  
Teléfono Sala Blanca  
Aspiradores filtro ULPA  
Productos Ultralimpieza  
Desinfectantes  
Desinfectador de manos  
Detergentes para Jaulas  
Sillas



Mobiliario: Mesas, Fregaderos,  
Estanterías, Carros, Armarios...  
Autoclaves de Vapor  
Lavadoras material de vidrio



## PRINCIPIOS ÉTICOS EN INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA CON MODELOS ANIMALES | 2010

1

Se debe evitar el uso de animales cuando exista un método alternativo que proporcione resultados satisfactorios.

2

El beneficio final del uso de animales de experimentación debe estar claramente definido en cada protocolo. La evaluación de la necesidad de su uso debe realizarse por un Comité Ético de Experimentación Animal.

3

Los ensayos que incluyen animales como modelo experimental deben realizarse en establecimientos usuarios registrados. Los animales deben proceder de establecimientos de cría registrados, con la únicas excepciones que se contemplan en la normativa vigente.

4

Las personas que tomen parte en los procedimientos con animales deben tener formación específica en ciencias del animal de laboratorio, adecuada al tipo de intervención que realicen. La salud y bienestar de los animales debe ser permanentemente controlada por personal legalmente capacitado.

5

Se debe utilizar el mínimo número de animales que garantice resultados estadísticamente fiables.

6

Los animales deben estar estabulados en jaulas y recintos que reúnan condiciones ambientales apropiadas para cada especie, en los que, además, puedan desarrollar comportamientos propios de su especie.

7

Los ensayos deben realizarse con un grado de refinamiento que evite dolor, sufrimiento o angustia innecesarios de los animales. Se deben establecer criterios de punto final, y pautas de anestesia y analgesia adecuadas en función de la severidad de cada procedimiento.

8

Para la eutanasia, cuando sea necesaria, se debe aplicar un método ético y científicamente aprobado que reduzca al mínimo el dolor y el estrés en los animales.

9

Normativa básica actual: REAL DECRETO 1201/2005, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.



## ¿Y tú qué Opinas?

**MaríadelMarRomeroAlemán**  
**MaximinaMonzónMayor**

Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

# El lagarto canario *Gallotia galloti* como animal de laboratorio

**S**e propone la utilización del lagarto canario *G. galloti* como animal de experimentación básica en el campo de la regeneración del Sistema Nervioso Central (SNC). Ello ha requerido la captura de los especímenes en su medio natural, con autorización previa de las instituciones locales, y su mantenimiento en cautividad durante al menos un año. Los animales en cautividad han tenido libre acceso al agua y los alimentos. Con objeto de compatibilizar el bienestar animal con la simplificación de sus cuidados se han utilizado 3 tipos de dieta en grupos diferentes de animales: 1) Dieta con predominio de carbohidratos consistente en una papilla a base de harina tostada de multicereales (gofio) y compota de frutas; 2) Dieta consistente en una papilla a base de preparados cárnicos comerciales para perros/gatos; 3) Dieta que alterna las anteriores. Se observa que estos animales sometidos a axotomía unilateral del nervio óptico y mantenidos en cautividad de larga duración pre-

sentan buen estado general de salud y supervivencia aceptable independientemente de la dieta utilizada.

**¿Y tú qué opinas?**

**¿Por qué se elige esta especie? ¿Cuáles son sus ventajas e inconvenientes?**

**¿Por qué son necesarios largos períodos de cautividad?**

**¿En qué se basa la utilización de las dietas propuestas?**

**SOLUCIÓN:**

Los modelos de regeneración del SNC de peces y anfibios son ampliamente conocidos. Sin embargo, la histofisiología del SNC de estos vertebrados es muy diferente a la de los mamíferos. El interés de este reptil

reside en que su SNC comparte características histofisiológicas comunes tanto con especies capaces de regenerar espontáneamente su SNC (peces y anfibios) como con especies incapaces (aves y mamíferos). De hecho, se ha demostrado recuperación tisular espontánea de la corteza cerebral (Romero-Alemán *et al.*, 2004) y recrecimiento axonal del nervio óptico (Lang *et al.*, 1998, 2002, 2008; Santos *et al.*, 2008; Romero-Alemán *et al.*, 2010) tras lesiones traumáticas. Actualmente se está evaluando la funcionalidad del sistema visual





de *G. galloti* a los 12-18 meses postlesión. Así, el modelo regenerativo de *G. galloti* y de escasos reptiles (Dunlop *et al.*, 2004), es el más cercano a los mamíferos y puede revelar las claves de la incapacidad regenerativa de estos últimos.

Además de lo mencionado anteriormente, la resistencia y adaptabilidad de estos animales son sus principales ventajas. La principal desventaja de este modelo es que son animales endémicos sujetos a cierta protección y que son inusuales en los animalarios.

El proceso de recrecimiento axonal en la vía óptica de *G. galloti* es lento, necesita entre 6-9 meses como mínimo, lo que requiere un largo período de cautividad.

Estos lagartos presentan en su medio natural una dieta omnívora a base de frutas e invertebrados (Valido-Amador, 1999).

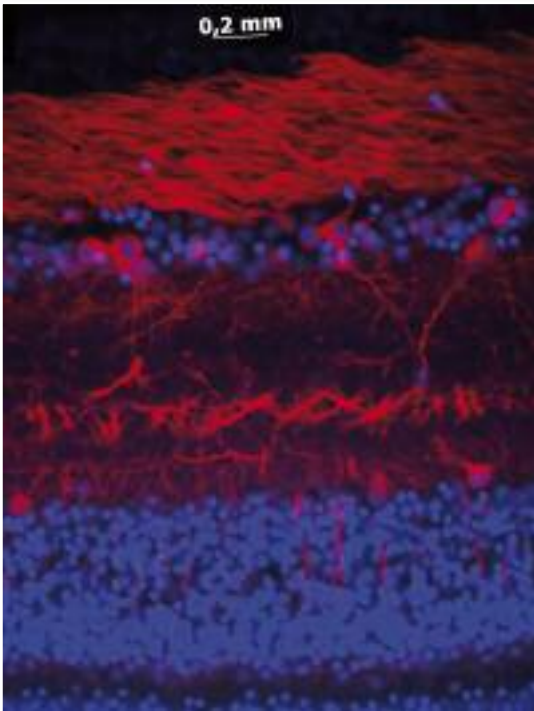


Imagen de la retina del lagarto *G. galloti*

## Bibliografía

- Dunlop S.A., Tee L.B., Stirling R.V., Taylor A.L., Runham P.B., Barber A.B., Kuchling G., Rodger J., Roberts J.D., Harvey A.R., Beazley L.D. *Failure to restore vision after optic nerve regeneration in reptiles: interspecies variation in response to axotomy*. J Comp Neurol 2004, 478: 292-305.
- Lang D.M., Monzón-Mayor M., Bandtlow C.E., and Stuermer C.A. *Retinal axon regeneration in the lizard Gallotia galloti in the presence of CNS myelin and oligodendrocytes*. Glia 1998, 23:61-74.
- Lang D.M., Romero-Alemán M.M., Arbelo-Galván J.F., Stuermer C.A., and Monzón-Mayor M. *Regeneration of retinal axons in the lizard Gallotia galloti is not linked to generation of new retinal ganglion cells*. J Neurobiol 2002, 52: 322-35.
- Lang D.M., Monzón-Mayor M., Romero-Alemán M.M., Yanes C., Santos E., and Pesheva P. *Tenascin-R and axon growthpromoting molecules are up-regulated in the regenerating visual pathway of the lizard (Gallotia galloti)*. Dev Neurobiol 2008, 68: 899-916.
- Romero-Alemán M.M., Monzón-Mayor M., Yanes C., and Lang D.M. *Radial glial cells, proliferating periventricular cells, and microglia might contribute to successful structural repair in the cerebral cortex of the lizard Gallotia galloti*. Exp Neurol 2004, 188: 74-85.
- Romero-Alemán M.M., Monzón-Mayor M., Santos E., and Yanes C. *Expression of neuronal markers, synaptic proteins and glutamine synthetase in the control and regenerating lizard visual system*. J Comp Neurol 2010, 518: 4067-87.
- Santos E., Monzón-Mayor M., Romero-Alemán M.M., and Yanes C. *Distribution of neurotrophin-3 during the ontogeny and regeneration of the lizard (Gallotia galloti) visual system*. Dev Neurobiol 2008, 68(1): 31-34.
- Valido Amador A. *Ecología de la dispersión de semillas por los lagartos endémicos canarios (g. Gallotia, Lacertidae)*. Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna 1999, pág. 333 (disponible online).



## Primer laboratorio anatomopatológico de España con la Normativa ISO 9001

Anapath es el primer **laboratorio de diagnóstico anatomopatológico** de España y primer laboratorio privado de Europa que ha sido certificado con la **Normativa ISO 9001:2008**





**GOVERNING BOARD**

2011-2015

**EXECUTIVE  
COMMITTEE**

**PRESIDENT**  
Patri Vergara,  
(SPAIN)

**VICE PRESIDENT**  
Naoko Kagiya,  
(JSLAR)

**SECRETARY  
GENERAL**  
Harry Rozmiarek,  
(U.S.A.)

**TREASURER**  
Guy De Vroey,  
(BELGIUM)

**ELECTED  
MEMBERS**

**NATIONAL  
REPRESENTATIVES**

Nikos Kostomitsopoulos,  
(GREECE)

Ouajdi Souilem,  
(TUNISIA)

Ekaterina Rivera,  
(BRASIL)

Gilly Griffin,  
(CANADA)

Hansjoachim Hackbarth,  
(GERMANY)

**SCIENTIFIC / UNION  
REPRESENTATIVES**

Ann-Christine Eklof,  
(SCAND-LAS, Sweden)

Parntep Ratanakom,  
(TALAS, Thailand)

Javier Guillen,  
(SECAL, Spain)

Cynthia Pekow,  
(AALAS, U.S.A.)

Marion Berard,  
(AFSTAL, France)

## **Press Release – International Council for Laboratory Animal Science New officers and Governing Board members**

**July 11, 2011:**

New officers and Governing Board members were elected at the General Assembly of the International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS) held in Istanbul, Turkey on June 12, 2011. Elections were for a four year term 2011-2015.

President: Patri Vergara, Spain

Vice President: Naoko Kagiya, JSLAR (Japan)

Secretary-General: Harry Rozmiarek, USA

Treasurer: Guy De Vroey, Belgium

### **National Representatives**

Nikos Kostomitsopoulos, Greece

Ouajdi Souilem, Tunisia

Ekaterina Rivera, Brasil

Gilly Griffin, Canada

Hansjoachim Hackbarth, Germany

### **Scientific/Union Representatives**

Ann-Christine Eklof, SCAND-LAS (Sweden)

Parntep Ratanakom, TALAS (Thailand)

Javier Guillen, SECAL (Spain)

Cynthia Pekow, AALAS (USA)

Marion Berard, AFSTAL (France)

ICLAS is a non-governmental and non-profit scientific organization for international cooperation in laboratory animal science. The ICLAS mission is to advance human and animal health by promoting the ethical care and use of laboratory animals in research worldwide. ICLAS was established in 1956 under the auspices of UNESCO, and is in official interaction with the World Health Organization (WHO), the International Union of Biological Sciences (IUBS), the Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS), and the World Veterinary Association (WVA). More information can be found on the ICLAS website [www.iclas.org](http://www.iclas.org) or by contacting the ICLAS Secretary-General.

Dr. Harry Rozmiarek, ICLAS Secretary-General

Philadelphia, Pennsylvania USA

Tel: 215-728-2525

Fax: 215-214-4040

[rozmiar@pobox.upenn.edu](mailto:rozmiar@pobox.upenn.edu)



# Perfiles relacionados con la ciencia del animal de laboratorio



**M. Antonia  
RubioCaballero**

**Lugar de trabajo:**

Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

**Breve descripción del cargo que ocupa:**

Responsable del Servicio de Experimentación Animal

**Años de experiencia:**

33 años

**Sociedades en las que participa:**

SECAL

**¿Cómo se inició en el campo de la Ciencia del Animal de Laboratorio?**

Empecé trabajando como técnico en el Departamento de Farmacología de Laboratorios Rocador S.A. En el estabulario teníamos: rata, ratón, perro y gato con los que realizábamos los procedimientos experimentales. En ese momento, me resultó atractivo el tema de trabajar con animales de experimentación y su finalidad. Cada vez me fue gustando más, aunque por aquel entonces la ética y el bienestar animal dependía únicamente del personal que trabajaba con los animales, pero tuve la suerte de trabajar con personas que eran sensibles al dolor de éstos y teníamos en cuenta muchas de las cosas que hoy en día están regladas.

Hice un paréntesis de 6 años para cuidar de mis hijos (en aquel entonces no daban excedencias y aproveche para tenerlos).

Posteriormente, me incorporé en el "Institut de Recerca del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau" como Técnico del Departamento de Neuropsicofarmacología y Responsable de los animales (ratas) que tenía dicho departamento en un pequeño estabulario. En el año 2000 me propusieron ocupar el cargo de Responsable del Servicio de Experimentación Animal del "Institut de





Recerca” de dicho hospital. Esto me llevó a realizar el Máster en Ciencia y Bienestar del Animal de Laboratorio en la UAB, que no sólo me aportó muchos conocimientos sino que también me proporcionó grandes amigos. Desde entonces, mis funciones en el estabulario son la de responsable y asesor en bienestar animal.

### **Resumen de su actividad profesional:**

Se podría resumir rápidamente. El 65% de mi tiempo me dedico a la gestión del Servicio de Experimentación Animal con todo lo que implica, personal, animales, protocolos, infraestructura, etc...el 15% al bienestar animal, el 8% al CEEA, y el 12% restante a formación, información, relaciones sociales y otros temas relacionados.

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

La verdad es que me interesa casi todo lo que hago, y me siento afortunada por ello. Desde una perspectiva más global, lo que más me preocupa es el saber coordinarlo todo de manera que se genere un buen clima de trabajo en el estabulario para lograr un buen funcionamiento. Si el personal que trabaja con los animales está contento y tranquilo, colabora mejor con los usuarios, presta más atención durante el cambio de los animales e informan de cualquier anomalía. Si se explican las cosas y se refuerzan las buenas conductas, éstas se repiten y se genera un buen clima de trabajo y una alta eficacia laboral

El bienestar animal y el control sanitario también me interesan pues de eso depende el buen resultado de los procedimientos que se desarrollan.

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

Pues mis objetivos son ambiciosos pero como siempre mejorar.

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

Lo primero y más importante es que te guste lo que estás haciendo. Lo segundo es crear un buen clima de trabajo y poder confiar en el personal que tienes, in-

fundir seguridad y tranquilidad, saber solucionar los problemas tanto para el personal que trabaja con los animales como para los usuarios. En definitiva, informar y saber escuchar.

Sobre todo velar por los animales de experimentación, pues si transmites que eso es importante para ti, los demás empatizan con esa forma de hacer/pensar y se consiguen resultados muy satisfactorios.

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

Hace muchos años que estoy en este mundo y puedo afirmar que durante este tiempo se ha hecho un largo camino, aunque aún queda mucho por delante.

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

Toni Ventura Rubio

M<sup>a</sup> Virtudes Céspedes





# The Weight is Over.

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

For more information, please contact us at [services@eu.crl.com](mailto:services@eu.crl.com)

Harlan Laboratories

Oncology

## Meet our Oncology Specialists.

(proven to deliver results)



Harlan Laboratories Models S.L.

Telf. 00.34.93.866.1261

Fax 00.34.93.866.0373

[harlanclientes@harlan.com](mailto:harlanclientes@harlan.com)

[www.harlan.com](http://www.harlan.com)

**harlan**<sup>™</sup>



Helping you do research better