

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

ANIMALES DE LABORATORIO

Verano 2013 . Número 58

Métodos Alternativos

Planteamientos alternativos
a la experimentación animal

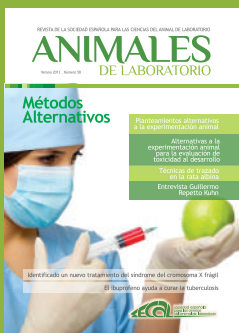
Alternativas a la
experimentación animal
para la evaluación de
toxicidad al desarrollo

Técnicas de trazado
en la rata albina

Entrevista Guillermo
Repetto Kuhn

Identificado un nuevo tratamiento del síndrome del cromosoma X frágil

El ibuprofeno ayuda a curar la tuberculosis



REVISTA DE LA SOCIEDAD
ESPAÑOLA PARA LAS
CIENCIAS DEL ANIMAL
DE LABORATORIO
<http://www.secal.es>

DIRECTORA

Teresa Rodrigo Calduch
direccion.revista@secal.es

SUBDIRECTOR

Hernán Serna Duque
direccion.revista@secal.es

RESPONSABLES SECCIONES

José Luis Martín Barrasa
Jesús Martínez Palacio
M^a Granada Picazo Martínez
Daniel Baizán Vicent
Hernán Serna Duque
Cristina Gerbolés Freixas
EDITORES DE ESTILO E IMAGEN
Olga Fernández Rodríguez
Juan de Dios Hourcade Bueno

PUBLICIDAD

Isabel Blanco
publicidad.revista@secal.es

FOTOGRAFÍA DE PORTADA
Fotolia

DISTRIBUCIÓN DE REVISTA
Carmina F. Criado

DISEÑO Y MAQUETACIÓN
CONEXION E.P.

clientes@agenciakonexion.com.co

IMPRIME

LCS REPROGRAF
DEPÓSITO LEGAL
M-1362-1999

PRESIDENCIA

Javier Guillén Izco (2011-2015)

VICEPRESIDENCIA

Antonio Martínez Escandell (2013-2017)

SECRETARIA

Elena Ciordia Balduz (2011-2015)

VICE SECRETARIA

Angel Naranjo Pino (2013-2017)

TESORERÍA

Isabel Blanco Gutiérrez (2011-2015)

VICE TESORERÍA

Carlota Largo Aramburu (2013-2017)

VOCALÍAS

Rosa Bonavía Abril (2011-2015)
Juan de Dios Hourcade Bueno (2013-2017)
Leticia Martínez Caro (2011-2015)
NorayBio (2013-2017)
Luis Parra García (2011-2015)
Anna Puyol Altarriba (2011-2015)
María Reyes Panadero (2013-2017)
Juan Rodríguez Cuesta (2013-2017)

*PERÍODO DE PERMANENCIA EN LA JUNTA
DE GOBIERNO.

SOCIOS BENEFACTORES:

ANADE
ANIMALARIA
ANTONIO MATACHANA S.A.
BIOESCAPE GmbH
BIOSIS S.L.
CENTRE D'ELEVAGE JANVIER
CHARLES RIVER LABORATORIES
DINOX S.L.
DYNAMIMED
ETYCA S.L.
PANLAB S.L.
GLAXO SMITHKLINE
GRANJA S. BERNARDO
HARLAN LABORATORIES MODELS
INSTALACIONES ELUR S.L.
MEVION TECHNOLOGY S.L.
NIRCO S.L.
NORAY BIOINFORMATICS S.L.U.
PROLABOR
RENTOKIL
RETTENMAIER IBERICA S.L.
SOURALIT
SDS DIETEX FRANCE
STERILTECH S.L.
STERIS
VESTILAB S.A.
VIVOTECNIA

Centrados en su investigación.

Como proveedor global de modelos de alta calidad de investigación, dietas y servicios de asistencia, Harlan Laboratories ha demostrado su rendimiento con equipos de investigación en todo el mundo. Nuestra misión es la de ayudarle a mejorar sus investigaciones.

Para más información,
visite nuestra Web www.harlan.com
o contacte con nosotros
en rms.es@harlan.com

Modelos

Dietas

Servicios



Índice



EDITORIAL

NOTICIAS

Actividades de la SECAL..... **8**

ACTUALIDAD

- Interfaces cerebro a cerebro vía internet entre dos ratas de laboratorio..... **10**
- Moléculas freno en la metástasis del cáncer de colon en ratones..... **11**
- Identificado un nuevo tratamiento del síndrome del cromosoma X frágil..... **12**
- El ibuprofeno ayuda a curar la tuberculosis.... **13**

ARTÍCULOS

- REMA, Red Española para el Desarrollo de Métodos Alternativos a la experimentación animal..... **14**
- Planteamientos alternativos a la experimentación animal..... **16**
- ATLA/FRAME Diagrama de planificación estratégica de programas de investigación..... **23**
- Alternativas a la experimentación animal para la evaluación de toxicidad al desarrollo **24**
- Versatilidad del ensayo del cometa para la evaluación genotoxicidad **31**
- Tecnología High-content screening (HCS) para la determinación del potencial hepatotóxico. **40**

TÉCNICAS

-Técnicas de trazado en la rata albina **45**

PRESIÓN POSITIVA

-El modelo animal en el proceso de investigación..... **49**

¿Y TÚ QUÉ OPINAS?

-Brote de mortalidad elevada en conejos californianos..... **54**

LIBROS Y PÁGINAS WEB

-Participa en la investigación: micro mecenazgo en f4r.org..... **57**

SEGURIDAD EN 5 MINUTOS

-Las nanopartículas y el sistema inmunitario **61**

ENTREVISTA

-Entrevista Guillermo Repetto Kuhn..... **63**

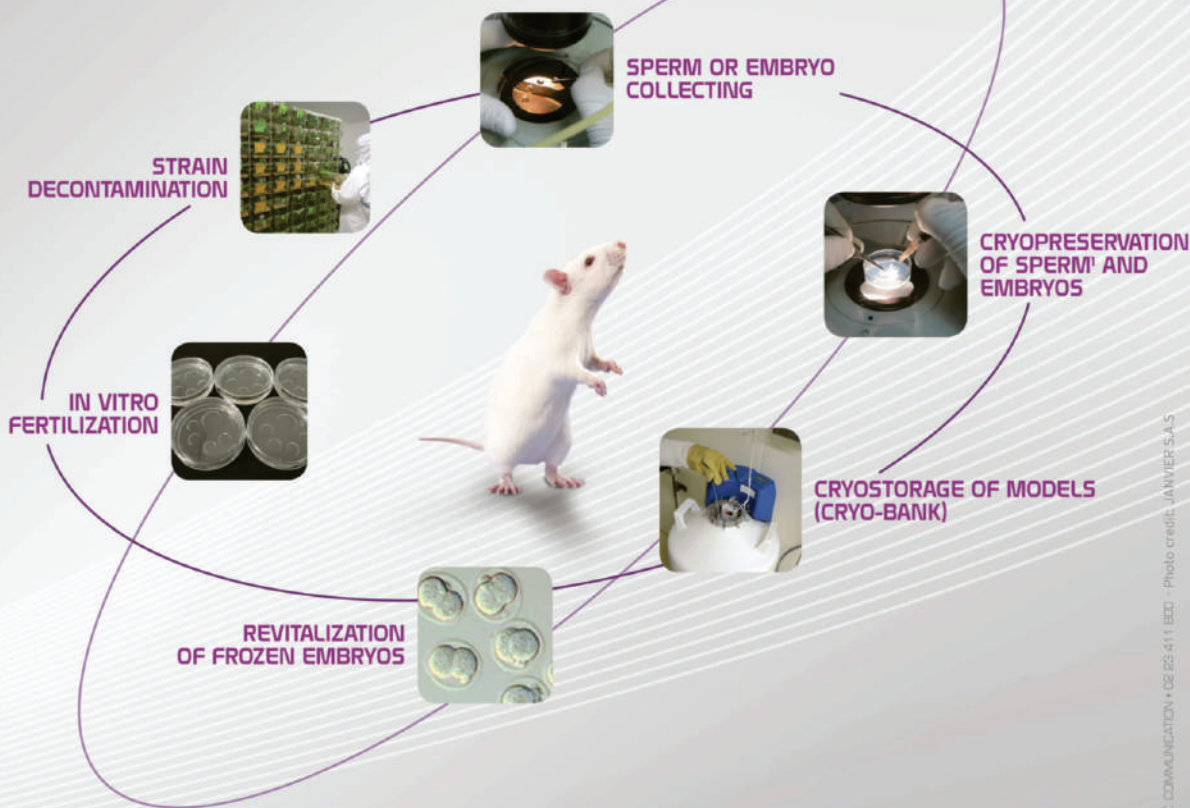
CRUSECAL..... **66**

SERVICES



CUSTOMIZED BREEDING SERVICES

REPRODUCTIVE SCIENCES



¹ Revitalization of cryopreserved sperm involving use of JAX[®] Mice strains is performed by The Jackson Laboratory. JAX[®] is a registered trademark of The Jackson Laboratory. All rights reserved.

AFHOC COMMUNICATION • DE 25 411 1800 - Photo credit: JANVIER S.A.S



Tel: +33 (0) 2 43 02 90 28
Fax: +33 (0) 2 43 02 00 15
E-mail : myproject@janvier-europe.fr
www.janvier-europe.com



In memoriam de Joan Albert Vericat

Joan Albert Vericat ha sido un eminente toxicólogo español. Se doctoró en Ciencias en la Universidad Autónoma de Barcelona, en la que ocupó varios cargos docentes hasta que en 1987 decidió continuar su carrera científica en la industria. Fue becario postdoctoral en Bionetics Research Inc., en el Instituto Frederick para la Investigación del Cáncer (EE.UU).

Trabajó para la industria farmacéutica en Italia, donde fue Jefe del Departamento de Toxicología Genética y Celular del Centro de Investigación de Toxicología, SpA; en Francia como Director del Departamento de Toxicología Genética y Exploratoria de Sanofi-Synthelabo; y en España, siendo Jefe del Departamento de Toxicología de J. Uriach & Compañía y director de desarrollo preclínico de Noscira SA., coordinando diversos proyectos de investigación de la Unión Europea.

Participó en las directivas de diferentes entidades internacionales relacionadas con las alternativas, siendo presidente de la Plataforma de Toxicología Industrial in Vitro y Tesorero de la Sociedad Europea de Toxicología in Vitro. Ha sido un miembro muy activo de la Junta de REMA, la plataforma Española de Alternativas. Fundó la Plataforma Española de NanoMedicina y estaba impulsando una sociedad de toxicólogos de la industria.

Desarrolló su interés por la docencia participando en numerosos másteres y cursos de formación relacionados con la experimentación, el desarrollo de medicamentos y el empleo de alternativas. Pocos días



antes de su fallecimiento en julio de 2012, hizo una presentación muy provocativa sobre la necesidad de una formación adecuada de los toxicólogos para satisfacer las necesidades de la industria.

Aunque es muy difícil describir a un amigo, Joan Albert era un autodidacta, un trasgresor, un innovador volcado en todo lo que hacía y siempre dispuesto a ayudar a todo el mundo.



Mobiliario y Equipamiento
en Acero Inoxidable

Vestuario

Ultralimpieza

Desinfectantes, Detergentes
y Lubrificantes Estériles

Sistemas de aplicación
de Desinfectantes

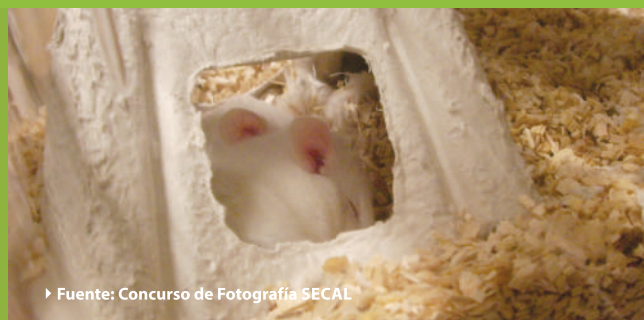
Monitoreación
Microbiológica en Continuo

Alfombras y Pavimentos
retenedores de partículas

Equipamiento de Sala Blanca

Actividades de la SECAL

El 22 de abril de 2013 se celebró por teleconferencia, una reunión ordinaria de la Junta de Gobierno de la SECAL. Resumen de los principales temas tratados.



► Fuente: Concurso de Fotografía SECAL

Relaciones internacionales

Laboratory Animals Ltd. (LAL)

Se plantean dos posibles estrategias a seguir en el 2014:

1. Continuar con la suscripción del 100 % de los socios de la SECAL durante el 2014 y negociar con la revista el porcentaje de socios necesario a partir del 2015 para mantener el precio reducido.

2. Consultar a los socios por la continuación de las suscripciones en el 2014 y en función de la respuesta negociar con la revista.

LAL ha decidido enviar un cuestionario a las asociaciones miembro para estudiar cómo están estructuradas, qué interés tienen en LAL, y qué mejoras quieren en el futuro; en función de las respuestas, decidirá una estrategia de futuro.

Relaciones nacionales

Legislación nacional

- Por el momento no hay quórum sobre la interpretación del Real Decreto en referencia a los OH (órganos habilitados) en las diferentes Comunidades Autónomas. En la Comunidad de Madrid, un CEEA de una Institución no puede evaluar proyectos de la misma Institución, sin embargo en la Junta de Andalucía la disposición es opuesta, los CEEA/OEBAs pueden evaluar los proyectos de sus investigadores.

- Respecto a la formación, se han publicado las directrices para la formación en la Comisión Europea, referentes a las funciones de cuidado de los animales, diseño y ejecución de procedimientos. No se ha publicado nada respecto a la formación que debe tener el responsable en bienestar y el veterinario designado. Cabe la posibilidad de que en España se forme una comisión evaluadora de cursos de formación similar a la que plantea formar la UE. La SECAL solicitará ser miembro de la Comisión y abstenerse de evaluar aquellos cursos de formación en los que participe de cualquiera de las formas para evitar el conflicto de intereses.

Otras actividades

Convenios

- Aprobación del convenio con COLVEMA (Colegio de Veterinarios de Madrid) en el que se formaliza el cambio de sede social de SECAL a las instalaciones de COLVEMA.
- Aprobación del convenio con SPCAL (Sociedad Portuguesa de Ciencias del Animal de Laboratorio) para la organización del XIII Congreso de la SECAL que se celebrará en Cáceres en el 2015.
- En trámite la formalización de un convenio con la Fundación Universidad Empresa y el Centro de Enseñanzas Virtuales de la Universidad de Granada para la realización de cursos virtuales.



INSTRUMENTACIÓN E INSTALACIONES CIENTÍFICAS

C/. Laguna del Marquesado 14, Nave 1
28021 MADRID
Teléfono: 91 710 95 47
Fax: 91 796 65 52
E-mail: steriltech@steriltech.net
www.steriltech.net

Proteja su Investigación de la Contaminación con la Tecnología Clarus™

Peróxido de Hidrógeno Vaporizado



- Totalmente escalable
- Libre de residuos
- Baja Temperatura
- Excelente compatibilidad de materiales



CLARUS™ Z
Especialmente diseñado para salas
▪ Salas hasta 500 m³



CLARUS™ C

- SAS Biológicos
- Salas hasta 350 m³
- Racks Ventilados
- Aisladores
- Lava-racks



CLARUS™ L

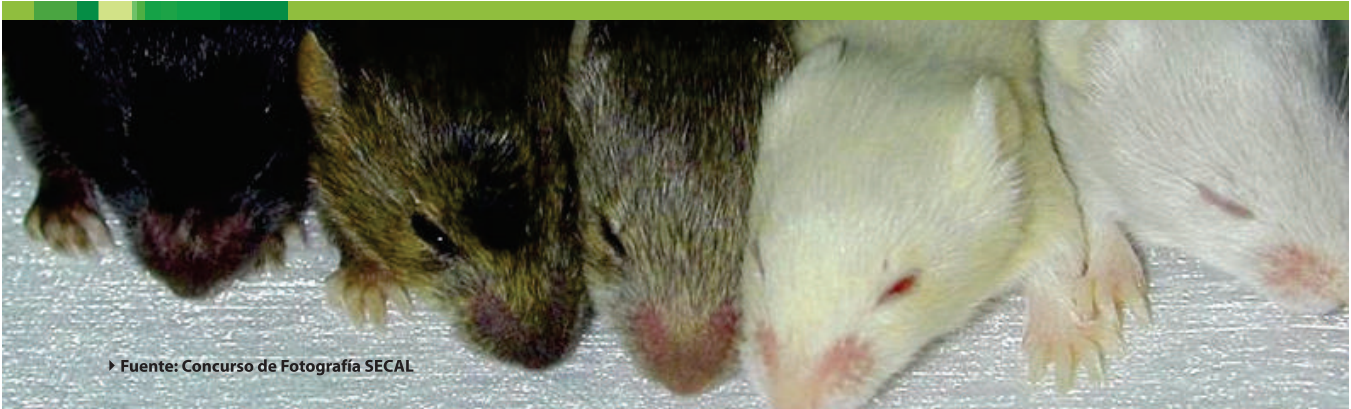
- Racks Ventilados
- Aisladores
- Incubadores de CO₂
- Lava-racks



BMT Iberia, s.l.
C/. Laguna del Marquesado 14, Nave 1
28021 MADRID
Teléfono: 91 7230347
Fax: 91 5054494
E-mail: bmtiberia@steriltech.net
www.bmtiberia.es

Esterilizadores a Vapor STERIVAP HP IL, VAKULAB, UNISTERI





► Fuente: Concurso de Fotografía SECAL

Interfaces cerebro a cerebro vía internet entre dos ratas de laboratorio

Investigadores de la Universidad de Duke (EEUU) y del Instituto Internacional de Neuro-ciencias de Natal (Brasil) han logrado establecer una conexión, vía internet, entre los cerebros de dos ratas de laboratorio.

<http://www.alnmag.com/news/brain-brain-interface-allows-transmission-information-between-rats>

<http://cienciahoje.uol.com.br/noticias/2013/02/transmissao-de-pensamento>

M. Pais-Vieira, M. Lebedev, C. Kunicki, J.Wang, and M.A.L. Nicolelis. **A Brain-to-Brain Interface for Real-Time Sharing of Sensorimotor Information.** Scientific Reports 3: 1319 | DOI: 10.1038/srep01

Miguel Nicolelis, de la Universidad de Duke, es un especialista en interfaces cerebro-máquina, es decir, en el uso dispositivos que leen la actividad de la corteza cerebral y la transmiten a un ordenador para que realice ciertas tareas. El grupo de Nicolelis ha utilizado una tecnología llamada microestimulación intracortical para lograr una interfaz cerebro a cerebro, transmitiendo en tiempo real información sensoriomotriz del cerebro de una rata en Brasil a otra en EEUU.

Se realizaron dos experimentos diferentes:

En el primer experimento, se registró la actividad neuronal de una rata en Brasil mientras realizaba una tarea de aprendizaje reforzada; en EEUU, otra rata "descodificadora" fue entrenada para aceptar la estimulación como algo normal. La información del córtex cerebral de la rata "codificadora" en Brasil se transmitió vía internet a la rata "descodificadora" de EEUU, que la recibió dos décimas de segundo más tarde.

El segundo experimento es similar pero se colocó el implante en el área que procesa la sensación táctil. Se entrenó a las ratas a explorar con sus bigotes un agujero e indicar si era estrecho o ancho. Las ratas "descodificadoras" en EEUU fueron capaces de indicar más de un 60 por ciento de las veces el ancho de un hueco que sólo las ratas "codificadoras" en Brasil pudieron explorar con sus bigotes.

Estos experimentos demostraron la capacidad de establecer un vínculo sofisticado, la comunicación directa entre cerebros de ratas, y que el cerebro decodificador funciona como un dispositivo de reconocimiento de patrones.

Moléculas freno en la metástasis del cáncer de colon en ratones

Un consorcio vasco de investigación compuesto por el Centro Vasco de Investigación en Biociencias (CIC bioGUNE), la Universidad del País Vasco (UPV/EH), el Instituto de Genética y Biología Molecular y Celular (IGBMC) de Estrasburgo (Francia), y la empresa *spin-off* Ikerchem, ha conseguido frenar el desarrollo del cáncer de colon y su metástasis en el hígado en un modelo experimental con ratones. En el estudio también han colaborado investigadores del Instituto de Química-Física Rocasolano, del CSIC y del Instituto Novartis de Investigación Biomédica.

Este avance, que podría abrir una nueva vía para el tratamiento futuro de dichas patologías, se ha conseguido creando unas moléculas que interfieren en la adhesión de las células tumorales con otras células del organismo, frenando tanto el crecimiento del tumor como la diseminación de las células tumorales y su proliferación en otros órganos.

El estudio, publicado en la revista *Journal of Medicinal Chemistry*, está basado en un trabajo previo de investigadores de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) en el que se describían una serie de moléculas que reducían la metástasis del melanoma en ratones. Dicho trabajo consistió en el diseño de inhibidores de la adhesión celular implicada en la metástasis de melanoma de ratones y la síntesis química de estas moléculas, comprobando su potencia y actividad biológica. Lo sorprendente fue que introduciendo cambios relativamente pequeños se podían generar nuevas moléculas con capacidad de inhibir la adhesión celular implicada en otro tipo de cáncer.

En la actualidad, el 90 % de las muertes por cáncer se producen por la reaparición del tumor original en otro lugar del cuerpo, por un proceso conocido como metástasis. El cáncer de colon no es de los de mayor índice de mortalidad, pero suele desarrollar metástasis en el hígado, que sí lo es. De hecho, este es el órgano en el que aparecen con mayor frecuencia metástasis.

El peligro letal derivado de la migración de las células cancerosas por el cuerpo es lo que empuja a los investigadores en la búsqueda de terapias para frenar la metástasis.

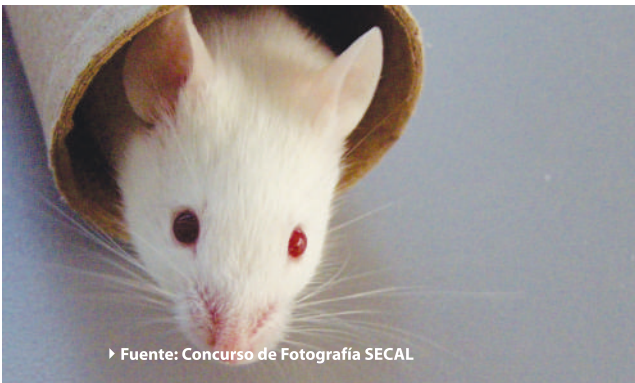


► Fuente: Concurso de Fotografía SECAL

<http://www.agenciasinc.es/Noticias/Crea-n-moleculas-que-frenan-la-metastasis-del-cancer-de-colon-en-ratones>

E. San Sebastián, T. Zimmerman, A. Zubia, Y. Vara, E. Martín, F. Sirockin, A. Dejaegere, R.H. Stote, X. Lopez, D. Pantoja-Uceda, M. Valcárcel, L. Mendoza, F. Vidal-Vanaclocha, F.P. Cossío, and F.J. Blanco. **Design, Synthesis, and Functional Evaluation of Leukocyte Function Associated Antigen-1 Antagonists in Early and Late Stages of Cancer Development.** *J. Med. Chem.*, 2013, 56 (3): 735–47.

Identificado un nuevo tratamiento del síndrome del cromosoma X frágil



► Fuente: Concurso de Fotografía SECAL

Un estudio realizado por el Laboratorio de Neurofarmacología de la Universidad Pompeu Fabra de Barcelona en colaboración con científicos del Centro de Regulación Genómica, del Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Médicas y de la Universidad del País Vasco, ha identificado un posible nuevo tratamiento para el síndrome del cromosoma X frágil (SXF), una enfermedad rara que es la segunda causa hereditaria de discapacidad genética tras el síndrome de Down.

Como su nombre indica, está relacionado con el cromosoma X, (por eso hay el doble de incidencia en mujeres, una de cada 4.000, que en hombres, uno de cada 8.000). Este síndrome es provocado por el déficit de un gen concreto, el FMR1, y es la única patología mental de la que se conoce cuál es el gen ausente que la provoca, lo que facilita su investigación.

Según el estudio, SXF se produce por una expansión en el promotor del gen FMR1 que causa el silenciamiento y la pérdida de la proteína FMRP ("fragile mental retardation protein"). Los pacientes con SXF presentan diferentes grados de discapacidad intelectual, déficit de atención, ansiedad, comportamiento autolesivo, comportamiento autista, macro-orquidismo, anomalías faciales y mayor incidencia de convulsiones.

El tratamiento consiste en un fármaco que bloquea los receptores cannabinoideos CB1, y que además de mitigar los efectos de esta enfermedad, permite mejorar la calidad de vida de los pacientes, puesto que con un único fármaco se incide en varios síntomas de la enfermedad.

El trabajo se ha realizado en un modelo murino (ratón Fmr1 knockout), que reproduce muchos de los síntomas del síndrome en humanos. El bloqueo normalizó el déficit cognitivo, la falta de sensibilización ante estímulos dolorosos y la susceptibilidad a padecer crisis epilépticas. Además de estas mejoras, también se observaron cambios a nivel bioquímico clave en el procesamiento cognitivo. Además, se normalizó el fenotipo de ansiedad reducida que presentan los ratones con este síndrome.

Ahora se deberá pasar a la fase clínica para confirmar que se repite lo que ocurre con ratones. La ventaja es que el circuito endocannabinoide es muy conocido, lo que indica por dónde se puede empezar.

<http://www.europapress.es/salud/noticia-descubren-farmaco-sindrome-cromosoma-fragil-causa-discapacidad-intelectual-20130401100153.html>

<http://www.upf.edu/enoticies/es/1213/0330.html#.UVwCLTf-3rQ>

A. Busquets-García, M. Gomis-González, T. Guegan, C. Agustín-Pavón, A. Pastor, S. Mato, A. Pérez-Samartín, C. Matute, R. de la Torre, M. Dierssen, R. Maldonado, and A. Ozaita. **Targeting the endocannabinoid system in the treatment of fragile X syndrome.** Nature Medicine 2013, 19(5):603-9.



► Fuente: Concurso de Fotografía SECAL

El ibuprofeno ayuda a curar la tuberculosis

Investigadores del Hospital Germans Trias i Pujol de Badalona han logrado demostrar que la ingesta de ibuprofeno ayuda a detener el desarrollo de la tuberculosis y aumenta la supervivencia de los afectados, en un experimento pionero realizado con ratones y publicado en la revista Journal of Infectious Diseases.

Este estudio, realizado con ratones infectados con *Mycobacterium tuberculosis*, abre las puertas a ensayos con humanos en este campo, con un medicamento ya aprobado y económico, como complemento a los antibióticos que se utilizan en la actualidad en personas que padecen tuberculosis.

Tras un mes del tratamiento con ibuprofeno, los investigadores comprobaron que en los animales tratados con este antiinflamatorio, el número de lesiones, su medida y las bacterias instaladas en el pulmón eran menores a los no tratados. Los ratones, eran capaces de sobrevivir hasta tres semanas más y, en la mitad de los casos, se mantenían con vida, por lo que el ibuprofeno, incluso estando a punto de morir, no sólo salva a los ratones sino que también "reduce la concentración bacteriana sin antibióticos".

La utilidad de ibuprofeno se centra en que reduce las inflamaciones, y es precisamente la inflamación que se genera para combatir la infección bacteriana en los pulmones la que provoca un aumento de la lesión tuberculosa y favorece el desarrollo de la patología.

Estos resultados altamente compatibles con la idea de la introducción del ibuprofeno en el tratamiento de la tuberculosis activa puede ser muy beneficioso para los pacientes, especialmente para aquellos que sufren de MDR / XDR (Multidrug-Resistant Tuberculosis y Extensively Drug-Resistant) Tuberculosis, que no tienen otra esperanza. El director de la Unidad de Tuberculosis Experimental del IGTP, Pere-Joan Cardona, ha explicado que los ensayos clínicos con humanos se podrán llevar a cabo con pacientes que "hayan desarrollado resistencias a los antibióticos y, que por lo tanto, no responden bien a los tratamientos actuales".

<http://unitatdetuberculosisexperimental.wordpress.com/>

<http://www.europapress.es/salud/investigacion/noticia-experimento-ratones-demuestra-ibuprofeno-aspirina-curan-tuberculosis-20130409133516.html>

C. Vilaplana, E. Marzo, G. Tapia, J. Díaz, V. García, and P.J. Cardona.

Ibuprofen is able to reduce the lung pathology, to decrease bacillary load in tissues and to increase survival in a new murine experimental model of active tuberculosis.

Journal of Infectious Diseases 2013, 208(2): 199-202.

REMA, Red Española para el Desarrollo de Métodos Alternativos a la experimentación animal

Guillermo Repetto

Universidad Pablo de Olavide, de Sevilla, y REMA

REMA, la Red Española para el Desarrollo de Métodos Alternativos a la experimentación animal, es un foro de encuentro y diálogo entre el mundo científico, la industria, la administración y los grupos sociales interesados en los métodos alternativos a la experimentación animal, incluidos los de defensa animal, con el fin de conseguir una mejor y más eficaz aplicación de los principios de reducción, refinamiento y reemplazo del uso de animales en la experimentación.

REMA integra y coordina las iniciativas de la Industria, la Administración y la Sociedad (protección animal, consumidores) con las del mundo científico para promocionar el desarrollo, validación, aplicación e implementación legal de métodos alternativos, especialmente de los procedimientos *in vitro*, e impulsa la divulgación y difusión de los requerimientos normativos y los avances alcanzados.

La representación y el apoyo de los cuatro sectores implicados es muy amplia, ya que REMA es apoyada por 20 entidades del mundo científico, entre las que pueden destacarse la a Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio y la Asociación Española de Toxicología, 4 entidades de defensa de los derechos de los animales y 17 entidades de la industria.

Desde 1999 REMA organiza, participa, apoya y difunde jornadas monográficas, cursos, reuniones y congresos científicos periódicamente, en los que se contemplan aspectos relacionados con el concepto de las 3R: Reducción, Refinamiento y Reemplazo del uso de animales en la experimentación.

REMA difunde información sobre alternativas mediante su portal en internet con noticias actualizadas sobre alternativas (<http://www.remanet.net>), realiza quincenalmente la difusión de actividades sobre alternativas por correo electrónico a las personas interesadas, dispone de un activo foro de discusión y debate sobre alternativas denominado 3ERRES con más de 400 suscriptores de 14 países y colabora con los medios de comunicación social.

REMA promociona las alternativas otorgando premios y becas de asistencia a congresos y reuniones sobre las mismas, ha organizado 6 jornadas generales de divulgación de alternativas y ha participado en más de 30 actividades científicas.

En la actualidad participan 4 observadores de la Administración en la Junta Directiva de REMA, como representantes del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad; del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente; y de la Dirección General del Medio Ambiente, de la Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio, de la Comunidad de Madrid.

Con la designación del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente como punto de contacto a efectos del cumplimiento de la Directiva 2010/63/UE y su integración en la Red Europea de Evaluación Preliminar de la Relevancia Reguladora (PARERE), REMA ha establecido un convenio de colaboración que incluye la evaluación de procedimientos y la participación en las reuniones periódicas del mismo.

Además, varios miembros de la Junta Directiva de REMA son expertos en la validación de métodos alternativos, habiendo participado en numerosas



Red Española para el Desarrollo de Métodos Alternativos a la Experimentación Animal

www.remanet.net

INICIO REMA ENTIDADES NOTICIAS CURSOS ACTIVIDADES ENLACES INFORMACIÓN INSCRIPCIÓN ENGLISH

ÚLTIMAS NOTICIAS

[JORNADA REMA IN MEMORIAM DE JOAN ALBERT VERICAT](#)

- 21-03-2013.-** Jornada Aspectos fundamentales del R.D. 53/2013 de protección de animales de laboratorio y su incidencia en la investigación", Universidad Miguel Hernández.
- 15-03-2013.-** Cierre plazo para el LRI Innovative Science Award: in the field of exposure assessment to quantify human health risks using hazard data that could be generated at multiple scales of biological organisation.
- 11-03-2013.-** Entrada en vigor de la prohibición en la UE de la comercialización de productos cosméticos cuyos ingredientes hayan sido ensayados en animales.
- 06-03-2012.-** OECD job vacancy: Senior Policy Analyst – Development of Test Guidelines (Job Number: 08545).
- 01-03-2013.-** Cierre de una convocatoria de manifestación de interés para agentes contractuales investigadores – grupo de funciones IV de la La Oficina Europea de Selección de Personal (EPSO).

[MÁS NOTICIAS](#)



reuniones de trabajo sobre validación a petición de la Comisión Europea o del Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para alternativas al ensayo con animales (EURL ECVAM).

REMA participa en el Comité español para la protección de animales utilizados con fines científicos y en el grupo de trabajo sobre animales utilizados en investigación de la Comunidad de Madrid.

REMA asesora a diferentes administraciones públicas sobre alternativas y evaluación toxicológica, particularmente en las normativas sobre compuestos industriales y cosméticos, como el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente; el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad; y el Ministerio de Economía y Competitividad.

Como actividades de formación, REMA ha organizado 7 cursos especializados sobre alternativas, 3 de ellos internacionales. Ha participado en más de 50 cursos de protección y experimentación animal de diversas categorías transmitiendo los conceptos

básicos y las estrategias para identificar alternativas en las bases de datos, y ha difundido procedimientos alternativos. REMA ha participado en cursos de formación de personal en todas las categorías contempladas por FELASA (B, C y D) en diferentes comunidades autónomas. Estos cursos se han dirigido a experimentadores, investigadores, directores de instalaciones de animales y a miembros de comités éticos de universidades, laboratorios y centros de investigación.

REMA ha participado desde diferentes vertientes en 7 proyectos nacionales y europeos de investigación de promoción y difusión de alternativas.

En el ámbito internacional, REMA es miembro fundador de ECOPA- la Plataforma Consensuada Europea sobre Alternativas, que engloba a las Plataformas Nacionales. REMA ha formado parte de su junta directiva, habiendo organizado el workshop de 2011. La inscripción en REMA es gratuita en la web <http://www.remanet.net>

Planteamientos alternativos a la experimentación animal

Guillermo Repetto

Universidad Pablo de Olavide, de Sevilla, y REMA

Sin duda alguna, la promoción de los "planteamientos alternativos" es uno de los aspectos básicos que impregnan la nueva normativa de protección animal. Esta es la terminología empleada en la Directiva 2010/63/UE, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos, en concreto "alternative approaches" en inglés, y consecuentemente en el Real Decreto 53/2013 (RD), por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. La denominación de planteamientos alternativos es muy acertada, ya que trasmite que es necesaria una actitud abierta a nuevas opciones, más que la simple sustitución de unos procedimientos por otros. Además, debe tenerse en cuenta que se ha ampliado el ámbito de aplicación para proteger también, por ejemplo, a los animales de los que se extraen tejidos para utilizarse en estudios *in vitro*.

Se describen los principales cambios normativos con el objetivo de facilitar la actuación de todos los implicados en su implantación, y considerar cómo esta promoción de los planteamientos alternativos requiere la participación de una gran variedad de entidades y organismos, además de los investigadores y sus centros.

El Artículo 1 indica que el RD regula el reemplazo y reducción de la utilización de animales en procedimientos, y el refinamiento de la cría, el alojamiento, los cuidados y la utilización de animales en tales procedimientos; el origen, la cría, el marcado,

los cuidados, el alojamiento y la eutanasia de los animales; las actividades de los criadores, suministradores o usuarios; la evaluación y autorización de proyectos en cuyos procedimientos se utilicen animales. Persigue que el número de animales utilizados en los procedimientos se reduzca al mínimo, aplicando en lo posible métodos alternativos; que no se les cause innecesariamente dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero; que se evite toda duplicación inútil de procedimientos; y que se les concedan, a los animales, los cuidados adecuados.

El Principio de reemplazo, reducción y refinamiento se define en el Artículo 4 del RD indicando que: "se utilizarán siempre que sea posible, en lugar de un procedimiento, métodos o estrategias de ensayo científicamente satisfactorios que no conlleven la utilización de animales vivos; el número de animales utilizados se reducirá al mínimo siempre que ello no comprometa los objetivos del proyecto; las actividades relacionadas con cuidados y los métodos se refinarán tanto como sea posible para eliminar o reducir al mínimo cualquier posible dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero a los animales". En la Tabla 1 se incluye una clasificación práctica de los principales planteamientos alternativos.

Tabla 1: Principales planteamientos alternativos

1. Evitar experimentos innecesarios <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> : Protocolos normalizados. Disponibilidad de estudios previos, intercambio de información. Flexibilidad. Estrategias inteligentes. Modelos en la enseñanza.
2. Modelos Computarizados (<i>in silico</i>) de Predicción e integración de datos.
3. Organismos inferiores: Bacterias, hongos, protozoos, algas, plantas, invertebrados.
4. Embriones en las etapas iniciales: peces, anfibios, reptiles, pájaros, mamíferos.
5. Métodos <i>In vitro</i> : Órganos, Cultivos, Sistemas acelulares.
6. Estudios animales: Reducción: número de animales usados. Refinamiento: minimización del dolor y distres; nuevos modelos.
7. Estudios en humanos.

Por lo tanto, existe una coincidencia total con las actividades que desde su fundación en 1999 realiza la *Red Española para el Desarrollo de Métodos Alternativos a la experimentación animal* (REMA), que es un foro de encuentro y diálogo entre el mundo científico, la industria, la administración y los grupos sociales interesados en los métodos alternativos a la experimentación animal, incluidos los de defensa animal, con el fin de conseguir una mejor y más eficaz aplicación de los principios de reducción, refinamiento y reemplazo del uso de animales en la experimentación.

Las obligaciones de las administraciones

Muy diversos actores tienen responsabilidades directas o indirectas relacionadas con los planteamientos alternativos, como los enumerados en la Tabla 2. Además de las obligaciones básicas de controlar la producción y el empleo de los animales de experimentación, la Directiva obliga a los Estados Miembros a velar por el uso de métodos alternativos, a designar un punto único de contacto de asesoramiento sobre normativas y propuestas de validación, a designar a los órganos habilitados para la revisión de los proyectos, a autorizar los estudios tras una estricta revisión previa y a inspeccionar anualmente al menos un tercio de los laboratorios.

Los órganos competentes han de asegurarse de la aplicación del principio de las 3R y contribuir al desarrollo y la validación de planteamientos alternativos que puedan aportar un nivel de información igual, o superior al obtenido en procedimientos con animales, pero que no utilicen o utilicen menos animales o impliquen procedimientos menos dolorosos.

El Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente ha sido designado como punto de contacto a efectos del cumplimiento del RD y a efectos de asesoramiento sobre la pertinencia normativa y conveniencia de los planteamientos alternativos, propuestos para su validación, que establecen, respectivamente, los Artículos 59.2 y 47.5 de la Directiva.

Tabla 2: Principales actores implicados en los planteamientos alternativos

Los órganos competentes en protección animal y particularmente el punto de contacto sobre alternativas (M ^o de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente): autorización previa.
Los órganos competentes en la protección de la salud pública, la seguridad o el medio ambiente.
La Administración General del Estado y los órganos competentes en investigación.
Los miembros del Comité español para la protección de animales utilizados con fines científicos.
Los órganos habilitados para la Evaluación de proyectos y la Evaluación Retrospectiva.
Los expertos que asesoran en la Evaluación de proyectos.
Los órganos encargados del bienestar de los animales (OEBA).
Los comités de ética de experimentación animal.
Los investigadores: capacitación y solicitud de autorización.

El Comité español para la protección de animales utilizados con fines científicos asesora a las autoridades competentes y a los órganos encargados del bienestar de los animales, e incluye un vocal representante de las organizaciones de carácter nacional, enfocadas al desarrollo y promoción de los métodos alternativos a la experimentación con animales, en este caso de REMA.

Aunque la *autorización* de los procedimientos es realizada por los *órganos competentes*, parece claro que la evaluación de los mismos ha de ser llevada a cabo por los *órganos habilitados*, que realizan:

- i) una evaluación de su finalidad, de los beneficios científicos que se prevén alcanzar, de su valor docente;
- ii) una evaluación de su conformidad con los requisitos de reemplazo, reducción y refinamiento;
- iii) una evaluación y clasificación del grado de severidad;
- iv) un análisis de los daños y beneficios, para determinar si los daños, el sufrimiento, el dolor y la angustia que se les puedan causar a los

animales están justificados por los resultados esperados, teniendo en cuenta consideraciones éticas y los beneficios que, en definitiva, pueda suponer el proyecto para los seres humanos, los animales o el medio ambiente. Puede recurrirse al asesoramiento de expertos, en particular, en las áreas de aplicación científica para las que van a utilizarse los animales, incluidos el reemplazo, la reducción y el refinamiento, así como el diseño experimental y la evaluación estadística.

La *Evaluación retrospectiva* por el órgano habilitado se realiza fundamentalmente a los proyectos severos o que empleen primates, así como a los de tipo II que incluyan procedimientos «moderados». Se centra en conocer si se han alcanzado los objetivos del proyecto; el daño infligido a los animales, incluidos el número y las especies de animales utilizados, y la severidad de los procedimientos; y cualquiera de los elementos que puedan contribuir a una mejor aplicación del requisito de reemplazo, reducción y refinamiento.

Por otra parte, la Administración General del Estado y los órganos competentes deben *fomentar la investigación* y velar por la *promoción de los planteamientos alternativos* y la difusión de la información sobre éstos a escala nacional. Ello debería dar lugar a la priorización de proyectos de investigación sobre planteamientos alternativos, tanto a nivel nacional como autonómico.

El investigador

Solamente pueden aplicar procedimientos con animales las personas capacitadas o autorizadas de forma temporal bajo supervisión responsable. La capacitación debiera incluir, entre otros muchos aspectos, el conocimiento de los requisitos de reemplazo, reducción y refinamiento.

Cuando el investigador pueda elegir entre diversos procedimientos, optará por aquellos que tengan las mayores probabilidades de proporcionar resultados satisfactorios y que cumplan el mayor número de los requisitos de las tres erres. Además, no deberá realizarse un procedimiento si la normativa de

la Unión Europea reconoce otro método u otra estrategia de ensayo para obtener el resultado perseguido que no implique la utilización de animales vivos. Este aspecto se describirá posteriormente, ya que se refiere a estudios de seguridad.

El investigador es responsable de presentar la *solicitud de evaluación del proyecto* ante el órgano habilitado, acompañada del *informe del comité ético*, de copia de la solicitud de evaluación del proyecto, y en el caso de los proyectos de tipo II y III, del *resumen no técnico*. Debe justificar, entre otros:

- 1) la aplicación de métodos para reemplazar, reducir y refinar el uso de animales;
- 2) el uso de anestésicos, analgésicos y otros medios para aliviar el dolor;
- 3) las medidas para reducir, evitar y aliviar cualquier forma de sufrimiento de los animales a lo largo de toda su vida;
- 4) el uso de puntos finales humanitarios;
- 5) la estrategia experimental o de observación y modelo estadístico para reducir al mínimo el número de animales utilizados, el dolor, sufrimiento, angustia y el impacto ambiental, cuando proceda;
- 6) la reutilización de animales y su efecto acumulativo sobre el animal;
- 7) la propuesta de clasificación de los procedimientos en función de su severidad;
- 8) las medidas para evitar la repetición injustificada de procedimientos;
- 9) las condiciones de alojamiento, zootécnicas y de cuidado de los animales;
- 10) los métodos de eutanasia;
- 11) la capacitación de las personas que participan en el proyecto.

El *Órgano Encargado del Bienestar de los Animales (OEBA)*, que en los centros usuarios se denomina *Comité de Ética de Experimentación Animal*, es una figura clave en este contexto. Asesora al personal sobre la aplicación del requisito de reemplazo, reducción y refinamiento, y lo mantiene informado sobre los avances técnicos y científicos en la aplicación de ese requisito. Además, elabora el informe para la

evaluación y realiza el seguimiento de los proyectos teniendo en cuenta su efecto sobre los animales utilizados, así como determinar y evaluar los elementos que mejor contribuyen al reemplazo, la reducción y el refinamiento.

Los estudios toxicológicos de seguridad y su validación

Sin duda alguna, ha tenido una gran repercusión mediática la prohibición, por la Unión Europea en 2013, de la evaluación de ingredientes cosméticos en animales, sobre todo cuando no se dispone todavía de procedimientos alternativos para evaluarlos adecuadamente. Otras legislaciones, como las de compuestos industriales, han sido más cautas y reducen los ensayos con animales a los imprescindibles, obligando a las empresas a compartir los resultados de los mismos. Con objeto de evitar duplicaciones innecesarias de ensayos realizados para evaluar la seguridad de sustancias y productos, los órganos competentes deben aceptar los datos de los resultados conseguidos en laboratorios de otros Estados miembros, obtenidos mediante procedimientos reconocidos por la legislación de la Unión Europea, salvo que deban realizarse otros procedimientos adicionales en relación con dichos datos para la protección de la salud pública, la seguridad o el medio ambiente.

Las legislaciones comunitarias exigen la realización de *evaluaciones de seguridad* no sólo a medicamentos, sustancias industriales, plaguicidas, vacunas, otros productos sanitarios, etc., sino también en otros ámbitos como la detección de toxinas en alimentos o el control de calidad de vacunas. Se trata de estudios que han de llevarse a cabo empleando procedimientos estandarizados, validados y aceptados por las agencias reguladoras, y que han de realizarse siguiendo las normas de buena práctica de laboratorio. Al tratarse de procedimientos muy controlados, habitualmente podrán ser tramitados por un procedimiento simplificado y no tendrán que someterse a evaluación retrospectiva (Proyectos tipo II).

La propia directiva (Artículo 48) ha impulsado el cambio de la denominación del Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM), que ahora se denomina *Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para alternativas al ensayo con animales (EURL ECVAM)*. El Laboratorio de Referencia de la Unión es responsable, en particular, de:

- ✓ coordinar y promover el desarrollo del uso de alternativas a los procedimientos incluso en los sectores de investigación básica y aplicada y en los ensayos reglamentarios;
- ✓ coordinar la validación de los planteamientos alternativos a nivel de la Unión;
- ✓ actuar como punto central para el intercambio de información sobre el desarrollo de los planteamientos alternativos;
- ✓ fijar, mantener y gestionar las bases de datos públicos y los sistemas de información sobre los planteamientos alternativos y su estado de desarrollo;
- ✓ promover el diálogo entre los legisladores, los reguladores, y todas las partes interesadas, en particular la industria, los científicos biomédicos, las organizaciones de consumidores y los grupos de bienestar animal con vistas al desarrollo, la validación, el reconocimiento internacional y la solicitud de planteamientos alternativos.

Con este cambio, EURL ECVAM es quien emite las recomendaciones sobre la validación de procedimientos, tras la evaluación científica de los estudios de validación por el *Comité Científico Asesor de ECVAM (ESAC)*. En la Tabla 3 se recogen los principales actores de estos procesos de validación.

Aunque no se incluye en la directiva, la Comisión Europea ha establecido además una *Red Europea de Laboratorios para la Validación de Métodos Alternativos (EU-NETVAL)* con objeto de facilitar la asignación y realización de los estudios científicos de validación de nuevos procedimientos de estudios de seguridad.

Tabla 3: Principales actores en la validación de métodos de evaluación de seguridad

EURL ECVAM: Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para alternativas al ensayo con animales.
ESAC: Comité Científico Asesor de ECVAM.
EU-NETVAL: Red Europea de Laboratorios para la Validación de Métodos Alternativos.
PARERE: Red Europea de Evaluación Preliminar de la Relevancia Reguladora
ESTAF: Foro de ECVAM de las Partes Interesadas.
Los Coordinadores Nacionales de Métodos de la UE y de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE).
ICCVAM: Comité norteamericano Interagencias para la Validación de Métodos alternativos.
Las agencias reguladoras: ECHA, EMEA, EPA, FDA...
Las empresas y sus consorcios.

En el paso previo a la validación, es decir, en la selección de los procedimientos que puedan someterse a la misma, también se han producido modificaciones importantes. En este sentido, la Comisión Europea ha tratado de implicar a los Estados Miembros y a otras entidades en el proceso de priorización de ensayos mediante la creación de dos redes. *La Red Europea de Evaluación Preliminar de la Relevancia Reguladora (PARERE)* está formada por representantes de los puntos nacionales de contacto sobre alternativas, mientras que el *Foro de las Partes Interesadas (ESTAF)* está formado por representantes de entidades que están afectadas por el empleo de los procedimientos. Por lo tanto, la Comisión Europea decide qué procedimientos pasan a ser validados mediante la colaboración de EURL ECVAM, PARERE y ESTAF.

Todos estos elementos han de armonizar sus actuaciones con los *Coordinadores Nacionales de Métodos* tanto de la UE como de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), como responsables últimos de la aceptación de los nuevos procedimientos, así como con el *Comité norteamericano Interagencias para la Validación de*

Métodos alternativos (ICCVAM).

Apoyo a los investigadores

Los cambios legislativos requieren un adecuado conocimiento de las sistemáticas de protección animal y de sus alternativas por parte de los investigadores. En la Tabla 4 se recogen varias herramientas que pueden ser muy útiles a los investigadores. Son muy prácticos los esquemas de toma de decisiones como el *Diagrama de Planificación Estratégica para Reducir el Uso de Animales en Ciencia Biomédica* publicado por el *FRAME Reduction Steering Committee*. Estos sistemas guían a los investigadores sobre aquellas fases que deben ir siguiendo en el desarrollo de sus experimentos.

Tabla 4: Principales herramientas de ayuda sobre planteamientos alternativos

Diagrama de Planificación Estratégica para Reducir el Uso de Animales en Ciencia Biomédica. FRAME http://www.frame.org.uk/page.php?pq_id=234
Buscaalternativas.com encuentra alternativas de reducción, refinamiento y reemplazo http://buscaalternativas.com/
Guía ECVAM de buena práctica de búsqueda de alternativas a los animales http://bookshop.europa.eu/en/the-ecvam-search-guide-pbLBNA24391/
Curso de Diseño experimental de MFW Festing. http://www.3rs-reduction.co.uk/
3Erres- Foro de Alternativas a la Experimentación animal http://www.rediris.es/list/info/3erres.es.html
SECAL-L: Foro de la Sociedad Española para las Ciencias del animal de Laboratorio http://www.secal.es/
Toxicol- Foro de Toxicología http://www.rediris.es/list/info/toxicol.html
COMPAMED Comparative Medicine Discussion List: mensaje a listserv@listserv.aalas.org y en el cuerpo: subscribe COMPAMED Nombre Apellido
IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee) Forum http://www.iacuc.org
REMA- Red Española para el Desarrollo de Métodos Alternativos http://www.remanet.net/

Las necesidades de capacitación del personal se han canalizado mediante la organización de cursos de formación en muy diversos centros. REMA ha participado en más de 50 de ellos y adicionalmente, ha

organizado directamente 6 jornadas y 5 cursos de perfeccionamiento.

Por otra parte, los investigadores demandan frecuentemente ayuda para poder adaptarse a la nueva situación. Como primer elemento de auxilio, en los últimos años se ha ido optimizando en gran medida la relación entre el investigador y el comité de ética de experimentación animal de su centro, que se ha convertido en un asesor de gran valía, y la fluidez de la relación ha conducido a una mejora general en la calidad de la investigación.

En relación a la localización de procedimientos alternativos diseñamos en 2005 la web *buscaalternativas.com* (<http://buscaalternativas.com/>) como una herramienta de ayuda para encontrar posibles alternativas en los ámbitos de reducción, refinamiento y reemplazo. Se presenta un módulo que explica cuáles son las limitaciones actuales, debidas a la inadecuada indexación sobre alternativas de las publicaciones científicas, y cuáles son las posibles vías para encontrar soluciones, como el empleo de la palabra "vitro". Además se presenta un módulo práctico para ejercitar la búsqueda de información en muy diversos ámbitos. Finalmente, se incluye el acceso a numerosas webs organizadas en 14 secciones: bases de datos; selección de la especie animal; diseño experimental; bienestar, cuidado y uso de animales; administración y extracción; observación y control; dolor, malestar analgesia e indicadores humanitarios; eutanasia; toxicología y procedimientos in vitro; cultivo celular; enseñanza y entrenamiento; simulaciones gratuitas; otros enlaces; y foros. ECVAM también ha publicado una guía de buena práctica de búsqueda de alternativas a los animales.

Aunque existen diversas webs especializadas en diseño experimental, debe destacarse especialmente el curso gratuito sobre reducción impartido en línea por Michael FW Festing.

Cuando no es posible localizar procedimientos útiles, puede solicitarse la ayuda a un experto, bien directamente o en foros de debate. Han de destacarse

en este ámbito a:

- *3Erres*- Foro de Alternativas a la Experimentación animal
- *SECAL-L*- Foro de la Sociedad Española para las Ciencias del animal de Laboratorio,
- *Toxicol*- Foro de Toxicología,
- *Farmacol*- Foro de Farmacología,
- *COMP MED*- Comparative Medicine Discussion List
- *IACUC* (Institutional Animal Care and Use Committee) Forum.

Por otra parte, REMA distribuye periódicamente información y noticias gratuitamente a todos los interesados sobre nuevos planteamientos alternativos, así como de cambios normativos, validación y aceptación de procedimientos de seguridad en toxicología reguladora.

En conclusión, aunque es necesaria la adaptación a la nueva situación, existen una serie de vías y herramientas que pueden facilitar el proceso.

Bibliografía

- Castaño A. y Repetto G. *Métodos alternativos. Generalidades*. En Ciencia y Tecnología en protección y experimentación animal. Martín Zúñiga J, Nora S, Universidad de Alcalá, 2009.

- Repetto M. y Repetto G. *Toxicología Fundamental*, 4ª Edición, Ed Díaz de Santos, Madrid, 2009.

Agradecimientos

Al Ministerio de Economía y Competitividad (proyecto CTM2012-31344) y a la Red Española para el Desarrollo de Métodos Alternativos.



1 gestión del animalario más sencilla



2 que cumple con la nueva directiva

Tu solución para la nueva Directiva UE 2010/63

3 para cualquier tipo de animalario

desde centros individuales

a complejas redes institucionales

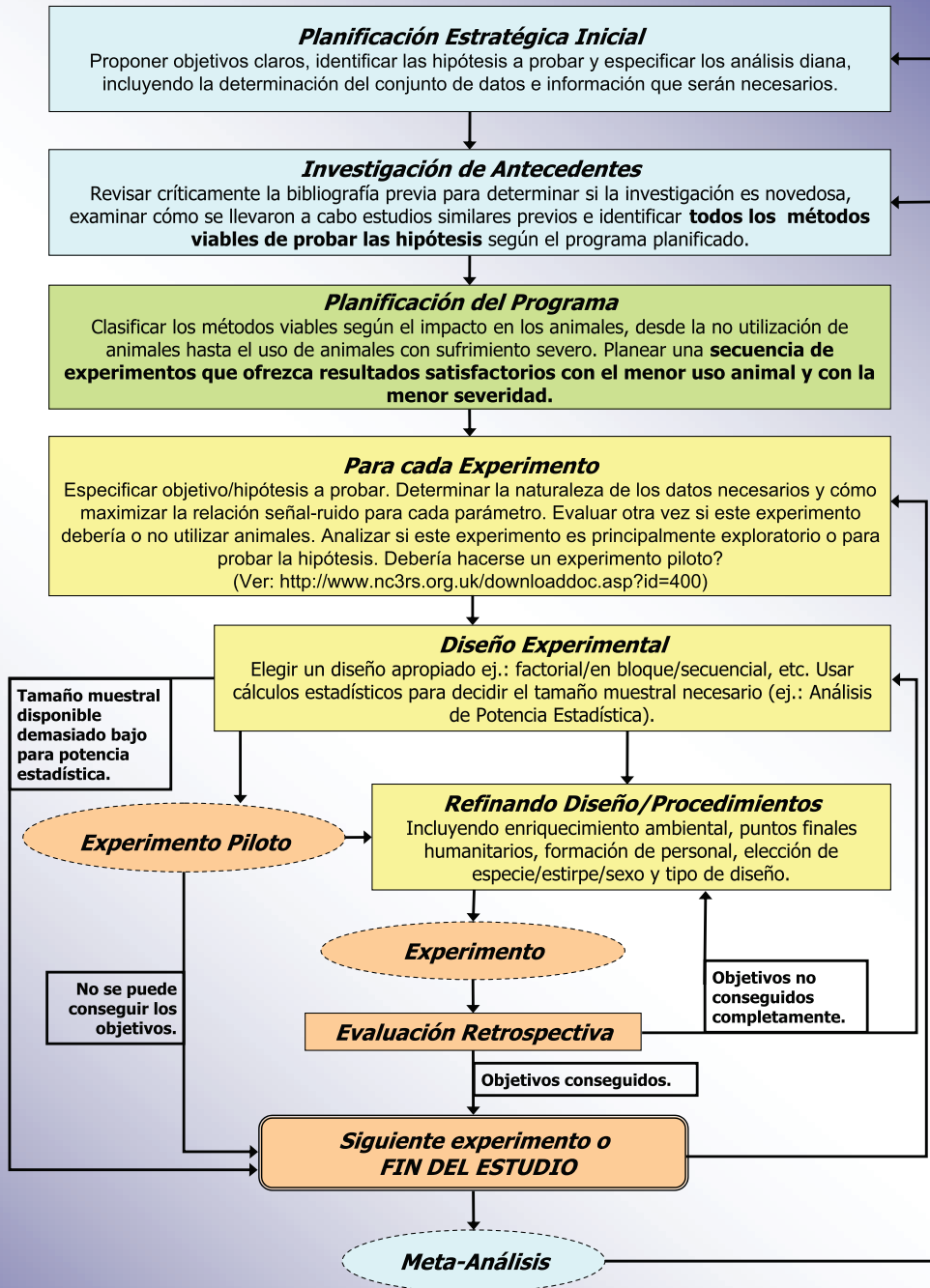
ANÚNCIATE
EN ANIMALES
DE LABORATORIO
LA REVISTA DE
LA SECAL

publicidad.revista@secal.es

MÁS DE 400 SOCIOS RELACIONADOS CON EL SECTOR DE LOS ANIMALARIOS.



Planificación Estratégica de Programas de Investigación



Alternativas a la experimentación animal para la evaluación de toxicidad al desarrollo

Miguel A. Sogorb¹, Jorge Estévez¹, Joaquín de Lapuente², Eugenio Vilanova¹

¹Unidad de Toxicología y Seguridad Química, Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández de Elche

²Centre de Recerca en Toxicologia (UTOX-CERETOX), Parc Científic de Barcelona

RESUMEN

La toxicidad al desarrollo puede dividirse en dos vertientes: la embriotoxicidad y la teratogenicidad. Los protocolos oficiales de ensayo de toxicidad al desarrollo *in vivo* son largos, económicamente costosos e implican la utilización de un alto número de animales de experimentación. Las alternativas a la experimentación animal disponibles para ensayar embriotoxicidad, sólo incluyen ensayos *in vitro*, en los que se estudia cómo la exposición a agentes químicos altera la diferenciación de células madre embrionarias. El método más extendido es el ensayo de células madre embrionarias de ratón, que estudia cómo se altera la diferenciación espontánea de células D3 hasta cardiomiocitos latentes como consecuencia de la exposición. Junto a parámetros relacionados con alteraciones en viabilidad celular de estas células y fibroblastos de ratón 3T3, este método es capaz de asignar tres grados de potencial embriotóxico. Los ensayos alternativos de teratogenicidad incluyen la utilización de embriones de diferentes especies (pollo, ratón, rata, rana o pez cebra) en los que, o bien se generan cultivos primarios a partir de estos embriones y se estudian alteraciones en la diferenciación (método de las micromasas de ratón, rata o pollo), o bien, se exponen *in vitro* o *ex-vivo* embriones de diferentes especies (roedores, rana o de pez cebra) en desarrollo durante la etapa de organogénesis a las sustancias evaluadas para luego determinar las malformaciones que aparecen. El método de las células madre embrionarias de ratón D3, el método de las micromasas usando embriones de rata, y el método de los embriones enteros de rata en cultivo han superado satisfactoriamente ensayos ciegos de validación interlaboratorio, aunque sus prestaciones todavía no permiten ser utilizados con finalidades reguladoras.

1.- INTRODUCCIÓN

La toxicidad a la reproducción es un fenómeno que puede dividirse en varias partes dependiendo de qué momento del proceso se vea afectado. Así, hablamos de toxicidad a la reproducción, tanto cuando se ve afectada la fertilidad de la generación parental, como cuando la afectación se produce en cualquier momento del desarrollo de la generación filial (desde la concepción hasta la madurez sexual). La toxicidad al desarrollo también se puede dividir a su vez en dos vertientes: la *embriotoxicidad* (cuando el efecto se estudia en el primer periodo del embarazo, entre la concepción y el desarrollo fetal); y la *teratogenicidad*, cuando el fenómeno se estudia después de la implantación del embrión (durante la organogénesis).

Necesidad de modelos alternativos para el estudio de la toxicidad al desarrollo

La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE)¹ dispone de 6 diferentes guías (414, 415, 416, 421, 422 y 426) para el estudio de toxicidad a la reproducción *in vivo* (Estevan *et al.*,

¹**Abreviaturas utilizadas:** ACDC = Método de células adheridas en diferenciación y citotoxicidad (por Adherent Cell Differentiation and Cytotoxicity); EST = Test de las células madre embrionarias (por embryonic stem cell test); EURL-ECVAM = Laboratorio europeo de referencia para alternativas a la experimentación animal (por European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing); FETAX = Ensayo de teratogénesis en embriones de rana (por Frog Embryo Teratogenesis Assay); IC50 3T3 = Concentración que reduce la viabilidad de las células 3T3 al 50% tras 10 días de exposición; IC50 D3 = Concentración que reduce la viabilidad de las células D3 al 50% tras 10 días de exposición; ICmax = La concentración más baja que causa la máxima tasa de malformaciones; ICNOEC TMS = Concentración más baja sin efecto observado en contador de anomalías morfológicas; ID50 = Concentración que reduce al 50% la diferenciación de, bien células D3 hacia cardiomiocitos en el método EST, o bien del brote de la extremidad superior de embrión de ratón hacia cartilago en el método de las micromasas; OCDE = Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico; WEC = Cultivo de embriones enteros (por Whole Embryo Culture).

2011). Además, recientemente se ha añadido la guía 443 para realizar estudios de toxicidad a la reproducción en una generación extendida. A pesar de la variedad de procedimientos validados disponibles, la normativa europea (REACH y otras de carácter específico como biocidas, fitosanitarios, etc.) sólo incluye ensayos con las guías 414, 416 y 421. La Tabla 1 muestra las principales características de estas 3 guías. Se observa cómo la aplicación de cualquiera de ellas lleva aparejado un alto costo económico y bioético, ya que implica la utilización de un alto número de animales de experimentación. No en vano, Hartung y Rovida estimaron en 2009 que los ensayos de toxicidad a la reproducción requeridos por el REACH supondrían un 90 y 70% respectivamente del número total de animales y del costo económico empleados en registrar una sustancia.

Tabla 1: Ensayos *in vivo* para la evaluación de la toxicidad a la reproducción

OECD	UE	Objetivo	Costo (€) ¹	Animales	
				requeridos ²	Tonelaje ^{2, 3}
414	B31	Teratogenicidad	Rata: 63.100 Conejo: 92.500	150	10-100
416	B35	Toxicidad a la reproducción (2 generaciones)	327.975	3200	100-1000
421	-	Escrutinio a la reproducción y desarrollo	54.597	560	10-100
415	B34	Toxicidad a la reproducción (1 generación)			
443	-	Toxicidad a la reproducción (1 generación extendida)			
422	-	Combinado de reproducción/desarrollo a dosis repetidas			
426	-	Neurotoxicidad al desarrollo			

¹ Estimación realizada por Fleischer (2007) en la segunda mitad de 2004 mediante una encuesta a 28 laboratorios de servicio europeos.

² Datos tomados de Höfer et al., 2004

³ Volumen de producción (toneladas/año) a partir del cual se requiere el ensayo según la normativa REACH.

Como se observa en la Tabla 1, las guías OCDE para estudios de reproducción contemplan, o bien el estudio en el mismo ensayo de alteraciones a la fertilidad, embriotoxicidad y teratogenicidad, o bien el estudio de teratogenicidad. Por lo tanto, no existe un ensayo *in vivo* de embriotoxicidad *per se*, ya que ésta tiene que ser ensayada junto a alteraciones en la fertilidad y a la teratogenicidad en los estudios de toxicidad a la reproducción a 1 o 2 generaciones.

Así pues, es fácil deducir que existe un gran interés en disponer de métodos alternativos de ensayos de embriotoxicidad y toxicidad a la reproducción que sean fiables, rápidos y seguros, ya que estos métodos tendrían un alto impacto económico y bioético sobre el desarrollo, registro y autorización de nuevas sustancias para cualquier aplicación que implicara exposición del ser humano. Estos métodos tendrían aplicación, por ejemplo, en escrutinios masivos llevados en las etapas iniciales del desarrollo de productos, o para comparar el potencial de toxicidad para el desarrollo de un nuevo producto químico, que es sólo una ligera modificación de una sustancia química existente, que ya ha sido probado *in vivo*; o para evitar la realización de ensayos *in vivo* para aquellas sustancias para las que se prevea una exposición muy baja.

Principales alternativas disponibles para el estudio de la toxicidad al desarrollo

La Tabla 2 muestra las principales alternativas disponibles actualmente para el ensayo de toxicidad al desarrollo. Como se observa, los ensayos de embriotoxicidad son ensayos *in vitro* con células madre embrionarias, en los que se estudian alteraciones en la diferenciación celular, mientras que los ensayos de teratogenicidad se basan en la exposición *in vitro* o *ex-vivo* de embriones de peces, anfibios o roedores, o bien en la diferenciación de células de embrión de 14 días, en el caso del método de las micromasas.

Tabla 2: Principales alternativas disponibles para el ensayo de toxicidad al desarrollo a la toxicidad a la reproducción

Embriotoxicidad	Teratogenicidad
Células madre embrionarias D3 (método EST)	Micromasas (rata, ratón, pollo)
Células adheridas en diferenciación y citotoxicidad (método ACDC)	Embrión entero en cultivo (rata, ratón)
	Embriones de pez cebra (<i>Danio rerio</i>)
	Embriones de rana <i>Xenopus</i>

2.- ALTERNATIVAS PARA EL ENSAYO DE EMBRIOTOXICIDAD

Las alternativas más desarrolladas para el ensayo de embriotoxicidad se basan en observar alteraciones en la diferenciación celular (Tabla 2). El ensayo más

empleado es el de las células madre embrionarias de ratón D3 (conocido por su acrónimo del inglés EST). Recientemente, también está tomando cierto auge el ensayo de células adheridas en diferenciación y citotoxicidad (conocido por su acrónimo del inglés ACDC), que está basado en los mismos principios que el EST, pero empleando la línea celular J1. El método EST se encuentra validado por el Laboratorio Europeo de Referencia para Alternativas a la Experimentación Animal (EURL-ECVAM), aunque sus prestaciones todavía no son suficientes para ser utilizado con finalidad reguladora (ESAC, 2002). Ambos métodos (EST y ACDC) presentan la ventaja sobre el resto de métodos descritos en este trabajo de que reemplazan totalmente la experimentación animal.

2.1. Método de células madre embrionarias de ratón D3 (EST)

Este ensayo utiliza como material biológico células madre embrionarias de ratón de la línea pluripotente D3 y fibroblastos diferenciados 3T3 de la misma especie, y basa su capacidad de predicción en determinar 3 variables diferentes, la capacidad del compuesto evaluado de alterar la diferenciación espontánea de células D3 hasta cardiomiocitos latentes (ID_{50}), y las alteraciones de viabilidad causadas por el compuesto en células D3 y 3T3.

El método se basa en dos fases claramente diferenciadas con el fin de calcular las variables necesarias para resolver las funciones lineales discriminantes. Los primeros 3 días de ensayo, las células entran en contacto con el producto en un cultivo en gota pendiente (adheridas por tensión superficial a la tapa superior de una placa petri) para formar el cuerpo embrioide. Durante dos días más se fomenta su crecimiento en placas sin adherencia, para dejar, durante los últimos 5 días, que tales cuerpos se expandan adheridos al fondo de una placa apropiada, al término de los cuales el cuerpo embrioide es capaz de latir (cardiomiocito latente, Figura 1). Este es el fundamento en el que se basa la técnica, por lo que cualquier producto que inhiba dicha diferenciación se clasificará como embriotóxico en mayor o menor medida. Una de las variables resultantes en el método EST es la llamada ID_{50} , que se define como la

concentración del compuesto evaluado capaz de inhibir al 50% la diferenciación de células D3 hasta cardiomiocitos latentes. Encontrará un vídeo de este proceso completo en:

<http://www.youtube.com/watch?v=-gPxGM606Ms>.



Figura 1: Cardiomiocito latente. Captura de pantalla de YouTube.

Además de la ID_{50} , el método EST también requiere de la determinación de otras dos variables, las denominadas IC_{50D3} e IC_{503T3} , que se definen como las concentraciones del compuesto evaluado capaces de reducir la viabilidad de cultivos celulares D3 y 3T3, respectivamente, hasta un 50% tras 10 días de exposición. Dichos parámetros se determinan siguiendo el método del azul de formazán, también conocido como ensayo del MTT.

Tabla 3: Funciones lineales de discriminación para la predicción de embriotoxicidad y teratogenicidad en los 3 modelos alternativos validados por el EURL-ECVAM. Tomado de Genschow *et al.*, 2002

Modelo de las células madre embrionarias D3 (EST)	
Función I =	$5,92 \log (IC_{50\ 3T3}) + 3,50 \log (IC_{50\ D3}) + 5,31 \frac{IC_{50\ 3T3} ID_{50}}{IC_{50\ 3T3}} - 15,7$
Función II =	$3,65 \log (IC_{50\ 3T3}) + 2,39 \log (IC_{50\ D3}) + 2,03 \frac{IC_{50\ 3T3} ID_{50}}{IC_{50\ 3T3}} - 6,85$
Función III =	$-0,125 \log (IC_{50\ 3T3}) - 1,92 \log (IC_{50\ D3}) + 1,50 \frac{IC_{50\ 3T3} ID_{50}}{IC_{50\ 3T3}} - 2,67$
Modelo de embriones enteros en cultivo (WEC)	
Función I =	$21 \frac{IC_{50\ 3T3} IC_{NOEC\ TMS}}{IC_{50\ 3T3}} + 15,37 \log (IC_{HRA}) - 23,58$
Función II =	$27 \frac{IC_{50\ 3T3} IC_{NOEC\ TMS}}{IC_{50\ 3T3}} + 17,71 \log (IC_{HRA}) - 32,37$
Función III =	$9,3 \frac{IC_{50\ 3T3} IC_{NOEC\ TMS}}{IC_{50\ 3T3}} + 4,21 \log (IC_{HRA}) - 4,23$
Modelo de micromasas	
Función I =	$6,65 \times \log (ID_{50}) - 9,49$
Función II =	$6,16 \times \log (ID_{50}) - 8,29$
Función III =	$-1,31 \times \log (ID_{50}) - 1,42$

Con estos tres parámetros y aplicando unas funciones de discriminación establecidas de manera empírica con compuesto modelo de embriotoxicidad conocida (Genschow *et al.*, 2002- Tabla 3), el método EST es capaz de determinar tres niveles de embriotoxicidad: embriotoxicidad fuerte, embriotoxicidad débil y no embriotoxicidad, según los criterios mostrados en la Tabla 4.

La generación de cardiomiocitos latientes es un proceso complejo y sobre todo difícil de cuantificar, ya que muchas veces los cuerpos embrionarios diferenciados no laten de manera homogénea, ni con frecuencia reproducible, e incluso no toda la superficie del cuerpo embrionario es contráctil. Esto hace que la cuantificación de los cardiomiocitos latientes generados tras la exposición al agente embriotóxico sea un proceso sometido a diversas incertidumbres (entre ellas las destrezas del operador) y que por lo tanto, si el efecto no es muy evidente, sea difícil distinguir entre agentes embriotóxicos débiles y no embriotóxicos. De hecho, el ensayo de validación del EST mostró una capacidad de predicción del 100% para embriotóxicos fuertes, pero sólo del 70 y 73% respectivamente para agentes no embriotóxicos y embriotóxicos débiles (Genschow *et al.*, 2002).

Tabla 4: Criterios de clasificación del potencial embriotóxico y teratogénico de acuerdo a los modelos de predicción mostrados en la Tabla 3. Tomado de Genschow *et al.*, 2002

Clasificación	Requerimientos
Fuerte	Función III > Función II y Función III > Función I
Débil	Función II > Función III y Función II > Función I
No embriotóxico o teratogénico	Función I > Función III y Función I > Función II

Atendiendo a estas limitaciones, el propio EURL-ECVAM ha emitido una serie de recomendaciones para mejorar las prestaciones del método EST. La más importante de estas recomendaciones es la necesidad de mejorar la cuantificación en la diferenciación a través de métodos moleculares (Spielman *et al.*, 2006). En este sentido, nuestro laboratorio ha demostrado que, utilizando como criterio para la cuantificación de alteraciones en la diferenciación la expresión de 6 genes diferentes biomarcadores de expresión de

tejidos de diferentes linajes celulares y las ecuaciones mostradas en la Tabla 3, es posible predecir correctamente la embriotoxicidad de 5-fluorouracilo, 5,5-difenilhidantoina y sacarina (Romero *et al.*, 2011, Pamies *et al.*, 2010). No obstante, también se han propuesto una larga serie de mejoras al EST que pasan por la utilización de transcriptómica, mejoras en las técnicas de cultivo, cuantificación de la diferenciación por citometría de flujo, o por técnicas de análisis de imagen computerizadas, e incluso en el proceso de discriminación entre diferentes niveles de embriotoxicidad dentro del grupo de los embriotóxicos débiles (Pamies *et al.*, 2011, Di Guglielmo *et al.*, 2010).

2.2. Método de células adheridas en diferenciación y citotoxicidad (ACDC)

El método de adherencia celular y citotoxicidad (Barrier *et al.*, 2011) es una variante del método EST con ciertas mejoras implementadas. Utiliza células madre de ratón de la línea J1, por considerarlas genéticamente más estables que las células D3, y utiliza, como criterio de cuantificación de alteraciones en la diferenciación de células pluripotentes J1 hacia cardiomiocitos, la expresión de la proteína mayoritaria en músculo cardiaco, la cadena pesada de la miosina. Esta expresión se corrige posteriormente con el número de células vivas, para distinguir entre alteraciones en la diferenciación debidas a mecanismos intrínsecos a ella misma y alteraciones en la diferenciación causadas por la caída de la viabilidad celular. La principal ventaja de este método sobre el EST es que permite la determinación de ambos parámetros sobre el mismo cultivo celular, además de reducir sustancialmente el tiempo de duración del ensayo. Sin embargo, uno de los puntos débiles de este método, y que comparte con el EST, es que solamente cuantifica alteraciones en la diferenciación hacia mesodermo (tejido del que proceden las células cardíacas). Esta desventaja queda solventada con nuestra propuesta de estudiar la diferenciación de células D3 sobre la base de la expresión de genes biomarcadores, ya que en la batería de genes propuestos están representados los principales linajes celulares (Romero *et al.*, 2011).

3.- ALTERNATIVAS PARA ENSAYOS DE TERATOGENICIDAD

Los métodos para ensayos de teratogenicidad de las micromasas y del cultivo de embriones enteros (WEC) de rata se encuentran ambos validados por el EURL-ECVAM, aunque sus prestaciones todavía no son suficientes para ser utilizado con finalidad reguladora (ESAC, 2002). El método de teratogénesis con embriones de rana (FETAX) también ha pasado estudios de validación (ICCVAM, 2000), pero al igual que los anteriores se encuentra en proceso de revisión para poder ser utilizado con finalidades reguladoras. También está tomando gran protagonismo el ensayo de pez cebra (*Danio rerio*), como lo demuestra el hecho de que ya exista un borrador para establecer una nueva guía OCDE con este modelo. Ninguno de estos ensayos reemplaza la experimentación animal, aunque sí reduce el número de animales necesarios frente a los protocolos *in vivo* de la OCDE, a la vez que refina estos procedimientos, ya que la exposición a las sustancias que se evalúan se efectúa *in vitro* o *ex-vivo*. Además, los procedimientos de FETAX, WEC y de pez cebra presentan la ventaja de que, en la mayoría de los casos, permiten determinar las anomalías morfológicas inducidas por la exposición al producto.

3.1. Método de las micromasas

El método de las micromasas utiliza cultivos primarios de los esbozos de las extremidades anteriores de embriones de rata de 14 días de gestación ("fore limb bud" en la Figura 2). El método basa su capacidad de detección de teratógenos en determinar el grado de proliferación del cultivo primario y la alteración del proceso de diferenciación de dichos cultivos a tejido cartilaginoso (paso fundamental en la generación del esqueleto, la proliferación y diferenciación celular y en las comunicaciones célula-célula y célula-matriz extracelular).

Así pues, los cultivos primarios se exponen a los potenciales teratógenos durante 5 días y finalmente se determina, mediante un colorante marcador específico de cartílago, la ID_{50} del compuesto, es decir,

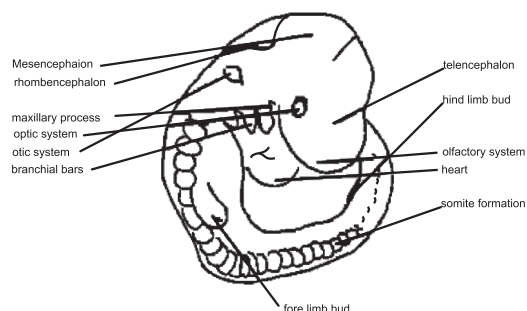


Figura 2: Morfología de embrión de rata. Tomado de EURL-ECVAM protocolo 123 (disponible en: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/view_doc.cfm?iddoc=247&tdoc=pr0t).

la concentración del compuesto capaz de inhibir un 50% la diferenciación de las células indiferenciadas. A partir de ahí, las funciones de discriminación lineal mostradas en la Tabla 3 han sido capaces de predecir el potencial teratogénico de los compuestos estudiados según los criterios mostrados en la Tabla 4.

Este método también se ha utilizado empleando como tejido biológico las mismas células pero procedentes de embriones de pollo, si bien el método de las micromasas no está validado en este modelo, y las funciones de discriminación de la Tabla 3 no son aplicables.

3.2. Método del cultivo de embriones enteros (WEC)

El método de embriones enteros en cultivo se basa en la exposición *ex-vivo* de embriones de rata a sustancias potencialmente teratógenas durante el periodo en que ocurren los procesos más relevantes de la organogénesis, como la formación del corazón, la formación de ojos y oídos, el cierre del tubo neural, el brote de las extremidades, etc.

Tras la obtención de los embriones a partir de madres gestantes, los embriones de 9.5 días de gestación (Figura 2) son expuestos al producto de ensayo en frascos cerrados y con diversas variaciones en la presión parcial de oxígeno y dióxido de carbono durante las 48 horas que dura el ensayo. Tras la exposición, se determinan las anomalías morfológicas de cada embrión expuesto de acuerdo a los parámetros funcionales, morfológicos y de

malformaciones detallados en la Tabla 5. Con estas puntuaciones se determina los parámetros IC_{NOEC} TMS (concentración más baja que no causa anomalías morfológicas observables) e IC_{max} (la más baja concentración que causa la máxima tasa de malformaciones), que junto al parámetro IC_{50T3} definido anteriormente para el método EST, permite predecir el potencial teratogéno de la sustancia evaluada según las funciones de discriminación mostradas en la Tabla 3 y de acuerdo a los criterios mostrados en la Tabla 4.

Tabla 5: Parámetros a analizar tras la exposición de embriones de rata o de ratón en el ensayo WEC. Tomado del protocolo oficial validado por EURL-ECVAM.

Parámetros de crecimiento	Malformaciones (0 para normal/1 para malformación)
Diámetro del saco vitelino (mm)	Yema del saco vitelino defectuosa
Longitud cráneo-rabadilla (mm)	Alantoides no fusionados con cono ectoplacentario
Longitud de la cabeza (mm)	Alantoides grandes
Parámetros funcionales (1 para normal/0 para anormal)	Flexión deficiente
Circulación en el saco vitelino	Saco pericárdico amplio lleno de fluido
Circulación en los alantoides	Corazón girado
Latido del corazón	Neuroporo posterior abierto
Desarrollo de somitas	Línea dorsal media irregular
Número final de somitas	Rombencéfalo abierto
Diferencia entre somitas finales e iniciales	Rombencéfalo estrecho
	Pliegues neurocraneales alineados irregularmente
Puntuaciones morfológicas	Cabeza pequeña y curvada hacia atrás
A Vasos sanguíneos del saco vitelino	Apariencia cráneo-facial anormal
B Alantoides	Tubo neural hemorrágico
C Flexión	Rombencéfalo grande y transparente
D Corazón	Rombencéfalo estrecho
E Tubo caudal-neural	Vesículas óticas deformadas
F Metencéfalo	Vesículas óticas deformadas
G Cerebro medio	Barras branquiales deformadas
H Cerebro anterior	Maxilares hinchados
J Sistema ótico	Mandíbulas macabadas
K Sistema óptico	Mandíbulas deformadas
L Sistema olfatorio	Somitas pequeñas
M Barras branquiales	Somitas irregulares
N Maxilares	Cola enroscada ¹
P Mandíbulas	Railles cortos y delgados
Q Miembros anteriores	Ampollas subcutáneas
R Miembros posteriores	Hemorragias
Puntuación morfológica total = (A + B + C + ... + R)	Otras

3.3. Método de teratogénesis con embriones de rana (FETAX)

El método FETAX utiliza embriones de sapo de uñas sudafricano (*Xenopus laevis*) como material biológico (Figura 3). Los embriones seleccionados entre el estrecho margen de tiempo que comprenden los estadios del desarrollo 8 y 11, se exponen durante 96 horas a diferentes concentraciones del compuesto evaluado, tras lo cual se determina la mortalidad, las malformaciones, el crecimiento (distancia entre la cola y la cabeza), la concentración mínima que inhibe el

crecimiento, y el índice de teratogénesis (relación entre la concentración que causa mortalidad al 50% de los embriones y la concentración que causa anomalías morfológicas en el 50% de los embriones). En este ensayo se consideran teratógenos aquellos compuestos para los que se den algunas de las siguientes situaciones:

- 1)- un índice de teratogénesis superior a 1.5;
- 2)- la relación entre la concentración mínima que inhibe el crecimiento y la que causa mortalidad al 50% de los embriones es inferior a 0.3;
- 3)- cuando el crecimiento se inhibe de una manera significativa a una concentración por debajo del 30% de aquella concentración que causa letalidad al 50% de los embriones (Borràs et al., 2003).

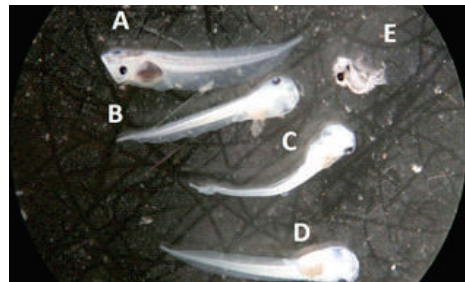


Figura 3: Embriones de *Xenopus laevis* empleados en un test FETAX. El embrión A es un embrión normal (no expuesto a teratogéno). Los embriones B a E son embriones que muestran diferentes niveles de afectación tras exposición a un control positivo de 6-aminonicotinamida

3.4. Ensayos con pez cebra

El pez cebra (*Dario rerio*) es un teleosteo ampliamente utilizado en estudios de desarrollo embrionario realizados en laboratorios, debido a que su patrón de desarrollo morfológico está bien establecido (Figura 4) y acontece en un periodo de tiempo muy reducido (72 horas desde la formación del cigoto hasta la eclosión de los huevos). Otra ventaja adicional es que los embriones de pez cebra son transparentes, lo que facilita la observación morfológica del embrión.

El ensayo de embriotoxicidad con pez cebra consiste en exponer los embriones a la sustancia que se desea probar para luego evaluar alteraciones en multitud de parámetros como mortalidad, tamaño, posición de ojos y cola, alteraciones en la formación de somitas, angiogénesis, apoptosis, etc. También se determina un índice de teratogenia, que se define de manera similar al descrito para el test de FETAX (Teixidó *et al.*, 2013).

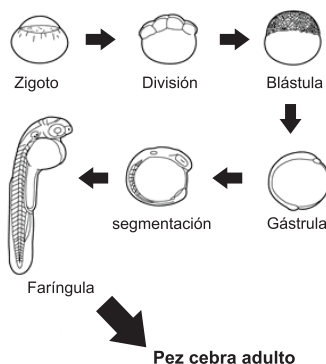


Figura 4: Estados embriológicos del pez cebra (*Danio rerio*)

CONCLUSIONES

Existen procedimientos alternativos para evaluar la capacidad de los compuestos químicos de alterar procesos tan complejos como el desarrollo embrionario. Para determinar la peligrosidad durante el desarrollo embrionario es conveniente aplicar una batería de ensayos que permita cubrir varios aspectos del proceso, empezando por ensayos celulares sencillos y avanzando hacia ensayos más complejos, que impliquen la exposición de embriones durante las etapas tempranas del desarrollo para evaluar las alteraciones en la organogénesis. Debido a que esta etapa de los organismos es particular de cada especie y a que hay que tener en cuenta que todos los ensayos expuestos en este documento son modelos de aproximación a la realidad, es conveniente que dicha evaluación incluya más de un ensayo con diferentes modelos experimentales, para así poder cubrir posibles problemas de extrapolación de efectos desde modelos de organización inferiores hasta el modelo de desarrollo humano.

Bibliografía

- Barrier M., Jeffay S., Nichols H.P., et al. *Mouse embryonic stem cell adherent cell differentiation and cytotoxicity (ACDC) assay*. *Reprod. Toxicol.* 2011, 31(4): 383-91.
- Borràs M., de Lapuente J. y Cruz R. *El sapo de uñas sudafricano (Xenopus laevis) como animal de laboratorio: aplicaciones en el estudio de la toxicidad sobre el proceso reproductivo*. *El test FETAX*. *Animales de Laboratorio* 2002, 17:8-11.
- Di Guglielmo C., López D.R., de Lapuente J., et al. *Embryotoxicity of cobalt ferrite and gold nanoparticles: a first in vitro approach*. *Reprod. Toxicol.* 2010, 30: 271-6.
- ESAC (European Centre for Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee) (2002) *The Use of Scientifically-Validated in Vitro Tests for Embryotoxicity*. Disponible en: http://hpcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurlecvam/scientificadviceholders-networks/publication/Embryotoxicity_statements.PDF
- Estevan C., Pamies D., Sogorb M.A., et al. *OECD guidelines and validated methods for in vivo testing of reproductive toxicity*. In: *Reproductive and Developmental Toxicology*. pp: 123-133. Ed: Ramesh G Gupta (2011). Academic Press.
- EURL-ECVAM. *Embryotoxicity Testing in Post-Implantation Whole Embryo Culture (WEC) - Method of Piersma*. Protocol 123. Disponible en: http://ecvamdbalm.jrc.ec.europa.eu/view_doc.cfm?iddoc=247&tdoc=prot
- Fleischer M. *Testing Costs and Testing Capacity According to the REACH Requirements - Results of a Survey of Independent and Corporate GLP Laboratories in the EU and Switzerland*. *J. Bus. Chem.* 2007, 4(3): 96-114.
- Genschow E., Spielmann H., Scholz G., et al. *The ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests: results of the definitive phase and evaluation of prediction models*. *European Centre for the Validation of Alternative Methods*. *Altern. Lab. Anim.* 2002, 30(2): 151-76.
- Höfer T., Gerner I., Gundert-Remy U., et al. *Animal testing and alternative approaches for the human health risk assessment under the proposed new European chemicals regulation*. *Arch. Toxicol.* 2004, 78(10): 549-64.
- Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM). *Minutes of the Expert Panel Meeting on the Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (FETAX): A Proposed Screening Method for Identifying the Developmental Toxicity Potential of Chemicals and Environmental Samples*, May 16-18, 2000. Available at: <http://iccvam.niehs.nih.gov/meetings/minutes/fetaxMin.pdf>
- Pamies D., Estevan C., Sogorb M.A., et al. *Mechanism-based models in reproductive and developmental toxicology*. In: *Reproductive and Developmental Toxicology*. pp: 135-146. Ed: Ramesh G Gupta (2011). Academic Press.
- Pamies D., Vicente-Salar N., Sogorb M.A., et al. *Specific effect of 5-fluorouracil on alpha-fetoprotein gene expression during the in vitro mouse embryonic stem cell differentiation*. *Int. J. Toxicol.* 2010, 29(3): 297-304.
- Romero A.C., Vilanova E., and Sogorb M.A. *Shortening and Improving the Embryonic Stem Cell Test through the Use of Gene Biomarkers of Differentiation*. *J. Toxicol.* 2011, doi: 10.1155/2011/286034.
- Rovida C. and Hartung T. *Re-evaluation of animal numbers and costs for in vivo tests to accomplish REACH legislation requirements for chemicals - a report by the transatlantic think tank for toxicology (t4)*. *ALTEX*. 2009, 26(3): 187-208.
- Spielmann H., Seiler A., Bremer S., et al. *The practical application of three validated in vitro embryotoxicity tests. The report and recommendations of an ECVAM/ZEBET workshop (ECVAM workshop 57)*. *Altern. Lab. Anim.* 2006, 34(5): 527-38.
- Teixidó E., Piqué E., Gómez-Catalán J., et al. *Assessment of developmental delay in the zebrafish embryo teratogenicity assay*. *Toxicol. In Vitro* 2013, 27(1): 469-78.

Versatilidad del ensayo del cometa para evaluar genotoxicidad

Amaya Azqueta, Adela López de Cerain

Departamento de Farmacología y Toxicología. Universidad de Navarra

1.- INTRODUCCIÓN

El ADN es una estructura química dinámica sujeta a modificaciones que pueden dar lugar a distintas alteraciones. Así, la exposición a compuestos químicos, partículas o radiación produce diferentes lesiones en el ADN de nuestras células tales como roturas simples y dobles de hebra, oxidación y alquilación de bases nitrogenadas, unión covalente de productos químicos (aductos), uniones cruzadas entre hebras, unión de proteínas, etc.¹ (Figura 1). Las lesiones en el ADN que no son reparadas pueden afectar a los procesos de transcripción, replicación y segregación y pueden dar lugar a mutaciones, transformaciones celulares y procesos tumorales.

La **toxicología genética** es la rama de la toxicología que se encarga de estudiar el efecto de los compuestos químicos, las partículas y las radiaciones

en el ADN. La genotoxicidad es un aspecto muy importante en la evaluación de la seguridad de nuevos compuestos. En la actualidad se cuenta con diferentes técnicas *in vitro* e *in vivo* para la detección de lesiones en el ADN; entre ellas, el ensayo de electroforesis de células aisladas o ensayo del cometa, que se emplea tanto *in vitro* como *in vivo*. El ensayo del cometa es fiable, sencillo, económico, rápido y muy versátil, por lo que en la actualidad, es uno de los métodos más utilizados para medir daño en el ADN.

2.- PRINCIPIOS DEL ENSAYO

El ensayo del cometa parte de una suspensión de células aisladas de diverso origen. El primer paso consiste en fijar dicha suspensión celular en una matriz de agarosa que se deposita sobre un portaobjetos, formando un fino gel. A continuación se lisan las células por inmersión en una solución tampón que contiene una alta concentración de sales y detergentes. De esta forma, se degradan las membranas celulares, los componentes solubles del citoplasma y el núcleo e incluso las histonas. Lo que queda después de lisar las células se denomina 'nucleoide' y consiste en ADN superenrollado y unido en intervalos a la matriz nuclear, formando una serie de lazos. El siguiente paso consiste en la desnaturalización del ADN en una solución muy alcalina (pH > 13) seguida de una electroforesis. La presencia de roturas en el ADN relaja la estructura del nucleoide, lo que posibilita su migración en el gel. Los siguientes pasos constan de diferentes lavados para neutralizar el ADN y eliminar las sales de la muestra. Por último, el ADN se tiñe con un fluoróforo intercalante y se visualiza al microscopio de fluorescencia. Cada célula genera una imagen que permite la cuantificación indirecta del daño en su ADN. Cuando el ADN está dañado las imágenes obtenidas se asemejan a los cometas estelares, con

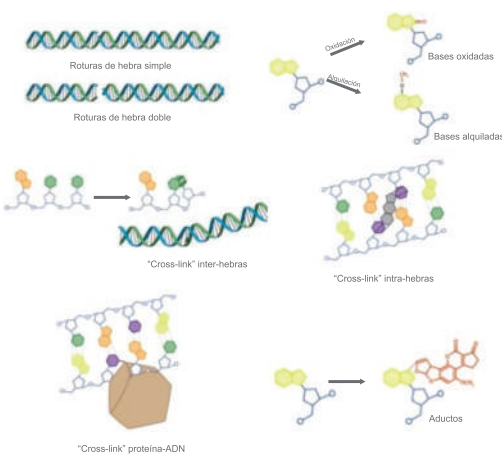


Figura 1: Esquema de diferentes lesiones del ADN. Adaptado de Azqueta y Collins, 2011²

una cabeza y una cola, de ahí el nombre del ensayo (Figura 2). Cuantas más roturas contenga el ADN de una célula, mayor cantidad pasará a formar parte de la cola del cometa.

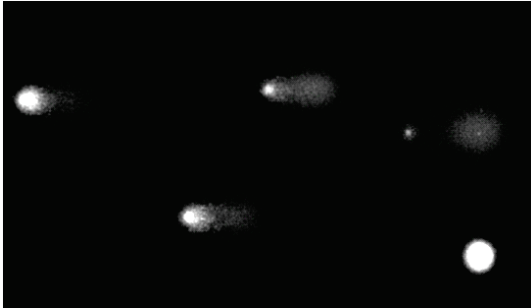


Figura 2: Imagen de cometas con diferentes niveles de daño obtenidos a partir de linfocitos humanos tratados con diferentes agentes genotóxicos

3.- HISTORIA DEL ENSAYO

La estructura del nucleóide fue descrita en 1976 por Cook y cols. como el ADN de la célula en estado super-enrollado y unido a una matriz nuclear en intervalos formando lazos, cada uno de los cuales corresponde a una unidad estructural³.

Estos autores observaron y describieron esta estructura tras el lisado de células HeLa en diferentes soluciones de lisis que contenían detergentes no iónicos y altas concentraciones de sales. Aunque las altas concentraciones de sales eliminan las histonas, el superenrollamiento del ADN se mantiene gracias a la compactación que le dan sus uniones con la matriz nuclear.

En 1978, Rydberg y Johanson desarrollaron un método para medir el daño en el ADN de células individuales⁴. Tras embeber linfocitos humanos en un gel de agarosa sobre un portaobjetos, lisarlos, desnaturar el ADN en una solución tampón débilmente alcalina y teñirlos con naranja de acridina, estimaron la intensidad del daño teniendo en cuenta la intensidad del verde y el rojo.

Hay que recordar que el naranja de acridina emite

un color verde cuando se une a las hebras dobles de ADN y un color rojo cuando se une a las hebras simples.

El ensayo del cometa fue descrito por primera vez en 1984 por dos investigadores suecos, Östling y Johanson⁵. Estos investigadores, conocedores de los trabajos anteriormente citados, obtuvieron cometas e incluso fueron capaces de diferenciar entre células irradiadas con rayos γ y células control. Para ello realizaron una lisis de 1 hora a pH 9.5, insuficiente para desnaturar el ADN, y una electroforesis corta pero muy agresiva en el mismo tampón.

Los autores afirman en este trabajo que las roturas en el ADN favorecen la relajación del ADN super-enrollado y su migración hacia el ánodo. Pocos años más tarde el método fue modificado por Singh y cols. quienes realizando la lisis a pH 10, incluyendo un paso de desnaturación del ADN a pH >13 y aumentando el pH de la electroforesis a >13, obtuvieron unas imágenes de nucleoides o cometas, provenientes de linfocitos humanos irradiados con rayos X o tratados con H_2O_2 , de muy buena calidad⁶. Este protocolo es muy parecido al que se utiliza actualmente para realizar el ensayo del cometa alcalino. Los autores de este trabajo consideraron que con este método se podían detectar roturas de cadena doble y simple, así como lugares sin base y fosfotriésteres.

Posteriormente, se han ido implementando modificaciones al protocolo del ensayo del cometa, que lo han convertido en una herramienta específica, sensible y muy versátil. Muchas de estas modificaciones serán expuestas en el siguiente apartado.

4.- MODIFICACIÓN DEL ENSAYO PARA DETECTAR DIFERENTES LESIONES EN EL ADN

4.1. Utilización de enzimas

Una de las modificaciones más significativas que ha sufrido el ensayo del cometa es la utilización de enzimas para detectar determinadas lesiones en el ADN. En 1993, Collins y cols. describieron la utilización de la enzima endonucleasa III (Endo III), que forma parte del sistema de reparación del ADN bacteriano y

es la encargada de detectar bases pirimidínicas oxidadas y romper el ADN en esos lugares⁷. La modificación del protocolo del ensayo del cometa incluye la incubación de los nucleoides con dicha enzima de forma que ésta produce roturas, adicionales a las ya presentes, en los lugares donde detecta bases pirimidínicas oxidadas.

Tres años más tarde, Dusinska y Collins describieron la utilización de otra enzima, la formamido pirimidina ADN glicosilasa (FPG), también del sistema de reparación del ADN bacteriano⁸. Esta enzima detecta bases púricas oxidadas, en especial las 8-oxoguaninas, y los lugares que resultan de la eliminación de bases púricas oxidadas o alquiladas. También detecta los aductos de guanina N7 abiertos producidos por los agentes alquilantes^{9,10}. En la actualidad, varias enzimas tanto de origen bacteriano como humano se utilizan de forma rutinaria en combinación con el ensayo del cometa para detectar diferentes lesiones: FPG para la detección de bases púricas oxidadas, en concreto 8-oxoguaninas; Endo III para la detección de bases pirimidínicas oxidadas; Alk A para la detección de bases alquiladas, más concretamente 3-metiladeninas¹¹; 8-oxoguanina glicosilasa (OGG1), la enzima análoga de la FPG pero de origen humano, para detectar bases púricas oxidadas de forma más específica (OGG1 no actúa sobre purinas alquiladas)¹²; T4 endonucleasa V (T4endoV) que detecta dímeros de pirimidina, inducidos por la luz UV¹³; y por último, la enzima uracilo ADN glicosilasa (UDG), que detecta las bases de uracilo que han sido erróneamente introducidas en el ADN¹⁴.

Algunas de las enzimas bacterianas (FPG, Endo III, Alk A, T4endoV y UDG) son producidas en cultivos bacterianos mediante la sobreexpresión del gen correspondiente y posterior purificación. Esto da la oportunidad de trabajar tanto con los productos puros como con extractos con diferente grado de pureza, en donde va a haber una mínima cantidad de otras enzimas bacterianas. Los extractos tienden a ser mucho más estables que las enzimas puras y por esa razón son más utilizados. El Profesor *Andrew R. Collins* de la Universidad de Oslo, produce y distribuye las enzimas FPG y EndoIII sin cargo alguno (el investigador interesado únicamente debe pagar los costes del envío).

En los últimos años, el ensayo del cometa en combinación con las enzimas de restricción HpaI y MspI, que reconocen secuencias 5'CCGG-3' pero son inhibidas por la presencia de citosinas metiladas, ha sido utilizado para medir metilación general del ADN^{15,16}.

Otras muchas enzimas están en fase investigación con la intención de ser utilizadas en combinación con el ensayo del cometa. Este es el caso de la enzima uvrABC que, además de detectar las distorsiones que la luz UV produce en el ADN, detecta también aductos.

La utilización de las enzimas aumenta considerablemente la sensibilidad del ensayo del cometa¹⁷. La enzima más utilizada actualmente es la FPG y el Comité Europeo sobre Daño Oxidativo (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage, ESCODD) concluyó que el ensayo del cometa en combinación con la enzima FPG, es menos preciso pero más exacto que los métodos cromatográficos, para detectar niveles basales de 8-oxoguanina en linfocitos humanos^{18,19}.

4.2. Otras modificaciones

El ensayo del cometa también se ha utilizado para medir de forma indirecta enlaces cruzados entre las hebras de ADN o con proteínas²⁰. Estas lesiones, al contrario de las roturas en el ADN, inhiben la migración de los lazos evitando así la formación de las colas de los cometas. De esta forma, un compuesto que induce este tipo de lesiones inhibirá la formación de cometas inducidos, por ejemplo, por el H₂O₂.

Los aductos en el ADN también pueden ser detectados de forma indirecta utilizando este ensayo²¹. Para ello, se inhibe la polimerasa alfa mediante la utilización de afidicolina, manteniendo así las roturas que se producen durante el proceso de reparación del aducto.

Para aplicar cualquiera de los dos procedimientos anteriores debemos tener indicios del mecanismo de acción del compuesto de estudio. Esto ayudará a interpretar los resultados correctamente.

5.- PROTOCOLO DEL ENSAYO DEL COMETA

5.1. Fases del protocolo

Existen varios protocolos publicados sobre cómo llevar a cabo el ensayo del cometa para evaluar la genotoxicidad de compuestos^{2,22,23}. Muy brevemente, el protocolo para la realización del ensayo del cometa estándar consiste en (Figura 3a):

- 1)- Inmovilizar la suspensión celular en agarosa sobre un portaobjetos.
- 2)- Lisar las células en una solución con una elevada concentración de sales y detergentes, a un pH alcalino, para la obtención de nucleoides.
- 3)- Desnaturalizar el ADN en una solución altamente alcalina.
- 4)- Electroforesis en la misma solución en la cual se realiza la desnaturalización.
- 5)- Neutralización y lavado de los nucleoides.
- 6)- Tinción de los nucleoides con un fluoróforo intercalante del ADN.
- 8)- Visualización de los nucleoides y obtención de los resultados.

En la versión combinada con enzimas, la incubación de los nucleoides en presencia de dichas enzimas se realiza antes de la desnaturalización del ADN, entre el paso 2 y 3 (Figura 3b).

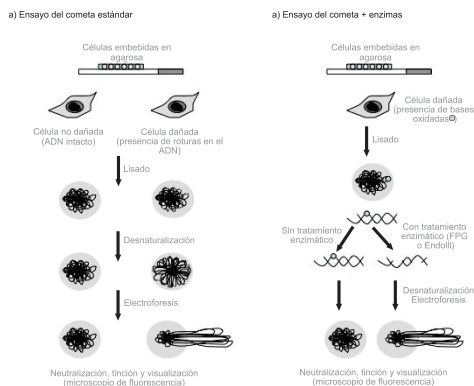


Figura 3: Esquema del ensayo del cometa sin (a) y con (b) la utilización de enzimas. Adaptado de Azqueta y cols., 2009²⁴

5.2. Obtención de resultados

Como hemos apuntado anteriormente, de cada una de las células se obtiene una imagen que permite cuantificar la cantidad de daño en el ADN de esa célula. Dicha cuantificación debe realizarse en al menos 100 cometas por muestra y puede efectuarse de diversas maneras. Los cometas pueden clasificarse visualmente en diferentes categorías, dependiendo de la cantidad de ADN que contienen en la cola. A partir de esta clasificación, se calcula un índice que nos da una idea del daño de la muestra²⁵ (Figura 4). Existen programas de análisis de imagen que calculan diferentes parámetros para cada cometa: longitud de la cola, cantidad de fluorescencia presente en todo el cometa, la cabeza y la cola, así como diferentes cálculos de momentos. El dato más utilizado es el porcentaje de fluorescencia en la cola del cometa con respecto a todo el cometa; este valor se corresponde con la cantidad de ADN presente en la cola y por lo tanto es proporcional a la cantidad de roturas del ADN de esa célula. Los programas de análisis de imagen más utilizados son los semiautomáticos, en los que el investigador debe seleccionar los cometas y el programa calcula los diferentes parámetros. Existen programas de análisis automáticos, muchos en fase de desarrollo, en los que todos los cometas presentes en la muestra son analizados. Los diferentes sistemas para el análisis de los cometas ofrecen resultados similares con ciertos matices; cualquiera de los métodos es válido²⁷.



$$\text{Índice de daño en el ADN} = (\% \text{ cometas clase } 0 \times 0) + (\% \text{ cometas clase } 1 \times 1) + (\% \text{ cometas clase } 2 \times 2) + (\% \text{ cometas clase } 3 \times 3) + (\% \text{ cometas clase } 4 \times 4)$$

Figura 4: Imágenes de las diferentes categorías utilizadas en el análisis visual de los resultados y fórmula utilizada para el cálculo de índice de daño en el ADN. Figura adaptada de Collins, 2004²⁶.

Una de las mayores ventajas del ensayo del cometa es la obtención de un dato para cada una de las células, lo que nos permite detectar poblaciones celulares con diferente sensibilidad al compuesto en estudio.

A la hora de hacer un análisis estadístico de los datos obtenidos con este ensayo hay que tener en cuenta que la unidad experimental es cada suspensión celular y por lo tanto, habrá que calcular la media o la mediana de los datos obtenidos con los cometas analizados, normalmente 100. Lovell y Omori en 2008, publicaron un artículo muy interesante referente al análisis estadístico que se debería aplicar a los resultados que se obtienen con este ensayo³⁸.

Cuando se utilizan enzimas para detectar diferentes tipos de lesiones, es necesario incluir una muestra en la que los nucleoides se incuben con el tampón fosfato sin la enzima. El valor que se obtiene en esta muestra hay que restarlo del valor que se obtiene al incubar los nucleoides con la enzima para obtener el daño neto detectado por dicha enzima.

Generalmente los datos obtenidos en el ensayo del cometa se publican sin ningún tipo de conversión. Sin embargo, se han realizado calibraciones teniendo como referencia el número de roturas inducidas por radiación ionizante, que se estima en 0.31 roturas por 10^9 Da de ADN tras una dosis de 1 Gy de rayos X o rayos γ y 29. Se han publicado varias curvas de calibración, existiendo algo de variación entre ellas³⁰.

5.3. Factores críticos que influyen en los resultados

Con el objetivo de estandarizar el ensayo del cometa y minimizar la variabilidad en los resultados, se ha estudiado el efecto de diferentes factores^{31, 32}. Se ha comprobado que la concentración de agarosa del gel, la duración del tratamiento alcalino y, lo más importante, el voltaje y la duración de la electroforesis, influyen en los resultados del ensayo del cometa. Cuando se utilizan enzimas, tanto su concentración como el tiempo de incubación son importantes. El análisis de los cometas también es una fuente de variación en los resultados³³. Los diferentes fluorocromos que se utilizan, la edad de la lámpara UV del microscopio de fluorescencia, el propio microscopio y los ajustes de los diferentes parámetros del programa de análisis de imagen son también factores a tener en cuenta.

El grupo europeo de validación del ensayo del cometa (European Comet Assay Validation Group, ECVAG) ha realizado ensayos interlaboratorio para detectar y analizar aquellos factores que afectan a la variación del ensayo del cometa³³⁻³⁶.

6.- EL ENSAYO DEL COMETA EN TOXICOLOGÍA REGULATORIA

A día de hoy, el papel del ensayo del cometa en toxicología regulatoria es escaso. Sin embargo, se utiliza mucho en el cribado de nuevos compuestos farmacéuticos, cosméticos y otros compuestos químicos. En la estrategia ICH para detectar la genotoxicidad de compuestos farmacéuticos actualizada en 2011³⁷, se contempla la utilización del ensayo del cometa en tejidos de roedores en el caso de obtener resultados positivos en los ensayos *in vitro* realizados previamente (Figura 5). El centro de validación de métodos alternativos japonés (Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods, JaCVAM) en colaboración con el centro de validación de métodos alternativos europeo (European Centre for the Validation of Alternative Methods, ECVAM), está llevando a cabo diferentes estudios de validación del ensayo del cometa con el fin de preparar las correspondientes guías OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development).

Se ha demostrado que el ensayo del cometa *in vitro* es tan sensible como el ensayo del micronúcleo, el de aberraciones cromosómicas y el de intercambio entre cromátidas hermanas³⁸. Hartmann y cols. obtuvieron los mismos resultados tras testar 13 compuestos con el ensayo del cometa y el de aberraciones cromosómicas³⁹. Kirkland y Speit mostraron, tras la realización de un estudio bibliográfico, que el ensayo del cometa detectó el 90% de 67 compuestos genotóxicos que daban resultados negativos o confusos en el ensayo del micronúcleo⁴⁰. Asimismo, detectó como negativos el 78% de los compuestos no genotóxicos. De estos estudios se puede concluir que el ensayo del cometa es un ensayo sensible a la vez que específico.

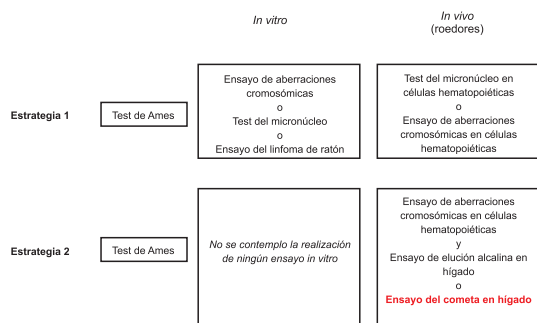


Figura 5: Esquema de la estrategia propuesta por la ICH para la evaluación de la genotoxicidad de productos farmacéuticos

Para interpretar los resultados de un ensayo de genotoxicidad, éstos deben ir acompañados de datos de citotoxicidad. El ensayo de proliferación celular es uno de los ensayos de citotoxicidad más conveniente a este respecto. Un buen ensayo de genotoxicidad debe ser capaz de detectar los efectos genotóxicos de un compuesto a concentraciones no citotóxicas o levemente citotóxicas.

Hasta la actualidad se ha utilizado el ensayo del cometa estándar, sin la utilización de enzimas, para estudiar la genotoxicidad de compuestos químicos. Recientemente, nuestro grupo ha realizado un estudio con diferentes compuestos conocidos (genotóxicos, citotóxicos no genotóxicos e inocuos) en el que se demuestra que la utilización del ensayo del cometa en combinación con la enzima FPG mejora la sensibilidad del ensayo sin afectar a su especificidad¹⁶. Además, esta variante permite detectar los efectos de los compuestos genotóxicos a concentraciones menos citotóxicas que el ensayo estándar.

7.- UTILIZACIÓN DEL ENSAYO DEL COMETA EN OTRAS ÁREAS

El ensayo del cometa se aplica en diversos tipos celulares: líneas celulares establecidas; células sanguíneas y de tejidos animales; hemolinfa de moluscos e insectos; levaduras; plantas. Así mismo, se puede emplear con distintos fines, células y tejidos humanos, tales como espermatozoides, células sanguíneas o de los epitelios dérmico, bucal, lacrimal,

nasal, de la lente ocular y la córnea, así como en células tumorales. El ensayo del cometa debe su gran versatilidad al hecho de poder aplicarse a cualquier célula eucariota, ya que lo que se precisa es simplemente una suspensión celular. Las condiciones de obtención de dicha suspensión con el mínimo daño en el ADN, deben establecerse en la puesta a punto de las diversas aplicaciones. El ensayo del cometa se ha realizado en cromosomas aislados⁴¹, y resulta también válido para estudiar diferentes vías de reparación del ADN⁴². Gracias a esta gran versatilidad, este ensayo traspasa el ámbito de la evaluación de la genotoxicidad de compuestos químicos, y se emplea también en biomonitorización humana, ecotoxicología e investigación básica.

8.-VERSIONES“HIGH-THROUGHPUT”

En los últimos años se han hecho numerosos esfuerzos con el fin de mejorar el rendimiento del ensayo. Generalmente, en cada portaobjetos se colocan dos geles de aproximadamente 70 µL, que contienen del orden de 10.000 células por gel, de las que tan sólo se evalúan 50 o 100. El número de portaobjetos que se puede manejar en un experimento depende del tamaño de la fuente de electroforesis, siendo éste el factor limitante. En la nueva versión desarrollada por Shaposhnikov y cols., cada portaobjetos contiene 12 minigeles de 5 µL cada uno conteniendo aproximadamente 250 células⁴³ (Figura 6). Además, este método ofrece la posibilidad de incubar cada uno de los geles de forma individual y por lo tanto, resulta ideal para utilizar en un mismo experimento diferentes enzimas, extractos celulares e incluso productos químicos. Esto es posible gracias a una cámara diseñada por este grupo de investigación y que actualmente es producida por Severn Biotech (www.severnbiotech.com) (Figura 7). Otra opción para mejorar el rendimiento del ensayo consiste en la utilización de películas de plástico (GelBond®: www.gelifesciences.com), del tamaño de una placa de 96 pocillos, donde se pueden colocar 96 minigeles. En este caso el investigador necesita de diferentes adaptadores para la manipulación de dichas películas⁴⁴.



Figura 6: Imagen de 12 minigeles de 5 µl en un portaobjetos y detalle de los minigeles. Adaptada de Azqueta y Collins, 2011²

Los resultados obtenidos utilizando los tres métodos anteriormente descritos (el convencional con dos geles y los dos alternativos de mayor capacidad), se han comparado en varios sistemas experimentales y han resultado equiparables⁴⁵. Sin embargo, algunas otras modificaciones ensayadas han resultado menos eficientes o de incómoda adaptación⁴⁶⁻⁴⁹.

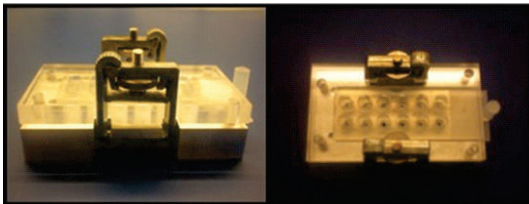


Figura 7: Prototipo de la cámara utilizada para incubar los geles de forma individual. Imagen adaptada de Azqueta y Collins, 2011²

Uno de los problemas que surgen al utilizar estas nuevas versiones es el enorme trabajo que supone la evaluación de los resultados. Como hemos dicho anteriormente, existen programas de análisis de imagen automáticos pero la mayoría de ellos, se encuentran en fases de desarrollo, sin haber cosechado mucho éxito hasta el momento por diversas razones: no son fáciles de manejar, requieren bastante tiempo para ponerlos a punto cada vez que van a ser utilizados y el investigador debe estar presente por los errores que se producen.

9.- ACLARACIONES SOBRE EL ENSAYO DEL COMETA

Existen varios aspectos del ensayo del cometa que siguen siendo confusos para muchos investigadores. Se apuntan a continuación algunos de ellos con intención de clarificarlos:

- *La cola del cometa está formada por lazos de ADN que son capaces de migrar durante la electroforesis.* Muchos investigadores siguen creyendo que la cola de un cometa está formada por fragmentos de ADN que migran durante la electroforesis. Shaposhnikov y cols. demostraron que esto no es cierto sino que lo que básicamente constituye la cola del cometa son lazos de ADN que se han relajado por la presencia de roturas⁵⁰.

- *El ensayo del cometa neutro no detecta únicamente roturas de hebra doble.* La formación de los cometas depende de la relajación de los lazos del nucleóide. A un pH neutro la presencia de roturas simples también produce la relajación de los lazos. En la versión alcalina, los lugares sin base nitrogenada, al menos algunos, se convierten en roturas y por esta razón se detecta más daño.

- *El ensayo del cometa no detecta células apoptóticas.* Los cometas en los que todo el ADN está prácticamente en la cola y cuya cabeza es muy pequeña, llamados en inglés "hedgehog cometa", son considerados por muchos investigadores indicadores de apoptosis. Varias investigaciones han demostrado que esto no es cierto y las razones son muy sencillas. En el proceso de apoptosis, el ADN se fragmenta dando lugar a hebras de sólo cientos de nucleótidos de longitud; en las condiciones en las que se realiza el ensayo del cometa estos fragmentos tras la electroforesis se pierden en el gel de agarosa. Hay que tener en cuenta que estos fragmentos son menores que el ADN mitocondrial y ya se ha demostrado que el ADN mitocondrial se difunde en el gel de agarosa incluso antes de la electroforesis y que se pierde completamente después de ésta⁵¹. Por otra parte, la cantidad de roturas que presentan este tipo de cometas es compatible con la viabilidad de las células, por lo que es imposible que se correspondan a células en apoptosis. Se ha demostrado en repetidas

ocasiones que las células que tras el ensayo del cometa dan lugar a este tipo de cometas son capaces de reparar completamente ese daño y proliferar⁵².

Tras estos argumentos conviene aclarar que dichos cometas pueden representar una fase muy temprana de apoptosis, pero necesitan confirmación con otras técnicas para considerarlas verdaderamente apoptóticas.

10.- CONCLUSIONES

El ensayo del cometa está ganando protagonismo para la evaluación de la genotoxicidad de productos químicos. Así, se espera que en los siguientes meses se publique la guía OECD para la realización del ensayo del cometa *in vivo*. Mientras tanto, uno de los objetivos de la "comunidad cometista" consiste en validar y estandarizar los protocolos utilizados actualmente para evitar o disminuir la variación intra e interlaboratorio.

Los últimos avances en cuanto al incremento en el rendimiento del ensayo urgen al desarrollo de programas informáticos de análisis de imagen automáticos. En la actualidad, el investigador debe pasar horas ante el microscopio para evaluar los resultados del ensayo.

Por otra parte, como en muchos otros ensayos, es fundamental comprender perfectamente las bases del ensayo para poder interpretar correctamente los resultados. Un aspecto clave en este sentido, es la posibilidad de reparación celular de las lesiones observadas, razón por la que el diseño experimental cobra mucha importancia.

El ensayo del cometa sigue en desarrollo, siendo los últimos avances la posibilidad de detectar metilación global y su aplicación en cromosomas aislados.

Bibliografía

1. Friedberg E.C., Walker G.C., Siede W. et al. *DNA damage. In: DNA repair and mutagenesis.* ASM Press. 2006.

2. Azqueta A. y Collins A.R. *The comet assay: a sensitive and quantitative method for analysis of DNA damage.* In: *Encyclopaedia of analytical chemistry.* Edited by R.A. Meyers. John Wiley and Sons. 2011.

3. Cook P.R., Brazell I.A., and Jost E. *Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA.* *Journal of Cell Science* 1976, 22: 303-24.

4. Rydberg B. and Johanson K.J. *Estimation of single strand breaks in single mammalian cells.* In: *DNA repair mechanisms.* Ed: P.C.Hanawalt, E.C.Friedberg and C.F.Fox, Academic Press, 1978

5. Ostling O. and Johanson K.J. *Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells.* *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1984, 123: 291-8.

6. Singh N.P, McCoy M.T., Tice R.R. et al. *A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells,* *Experimental Cell Research* 1988, 175: 184-91.

7. Collins A.R., Duthie S.J., and Dobson V.L. *Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA.* *Carcinogenesis* 1993, 14: 1733-5.

8. Dusinska M. and Collins A.R. *Detection of oxidised purines and UV-induced photoproducts in DNA of single cells, by inclusion of lesion-specific enzymes in the comet assay.* *Alternatives to Laboratory Animals* 1996, 24: 405-11.

9. Li Q., Laval J. and Ludlum D.B. *FPG protein releases a ring-opened N-7 guanine adduct from DNA that has been modified by sulfur mustard.* *Carcinogenesis* 1997, 18: 1035-8.

10. Speit G., Schütz P., Bonzheim I. et al. *Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay.* *Toxicology Letters* 2004, 146: 151-8.

11. Collins A.R., Dusinska M., and Horska A. *Detection of alkylation damage in human lymphocyte DNA with the comet assay.* *Acta Biochimica Polonica* 2001, 48: 611-14.

12. Smith C.C., O'Donovan M.R., and Martin E.A. *hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDIII.* *Mutagenesis* 2006, 21: 185-90.

13. Collins A.R, Mitchell D.L., Zunino A. et al. *UV-sensitive rodent mutant cell lines of complementation groups 6 and 8 differ phenotypically from their human counterparts.* *Environmental and Molecular Mutagenesis* 1997, 29: 152-60.

14. Duthie S.J. and McMillan P. *Uracil misincorporation in human DNA detected using single cell gel electrophoresis.* *Carcinogenesis* 1977, 18: 1709-14.

15. Wasson G.R., McGlynn A.P., McNulty H. et al. *Global DNA and p53 Region-Specific Hypomethylation in Human Colonic Cells Is Induced by Folate Depletion and Reversed by Folate Supplementation.* *The Journal of Nutrition* 2006, 136: 2748-53.

16. Wentzel J.F., Gouws C., Huysamen C. et al. *Assessing the DNA methylation status of single cells with the comet assay.* *Analytical Biochemistry* 2010, 400: 190-4.

17. Azqueta A., Arbillaga L., Lopez de Cerain A. et al. *Enhancing the sensitivity of the comet assay as a genotoxicity test, by combining it with bacterial repair enzyme FPG.* *Mutagenesis* 2013, 28: 271-7.

18. ESCODD. *Measurement of DNA oxidation in human cells by chromatographic and enzymic methods,* *Free Radical Biology & Medicine* 2003, 34: 1089-99.

19. ESCODD. *Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study,* *FASEB Journal* 2005, 19: 82-4.

20. Pfuhrer S. and Wolf H.U. *Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline comet assay.* *Environmental and Molecular Mutagenesis* 1996, 27: 196-201.

21. Speit G., Schütz P., and Hoffmann H. *Enhancement of genotoxic effects in the comet assay with human blood samples by aphidicolin*. Toxicology Letters 2004, 153:303-10.
22. Tice R.R., Agurell E., Anderson D. et al. *Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing*. Environmental and Molecular Mutagenesis 2000, 35:206-21.
23. Collins A.R. and Azqueta A. *Single cell gel electrophoresis combined with lesion-specific enzymes to measure oxidative damage to DNA*. Methods in Cell Biology 2012, 112:69-92.
24. Azqueta A., Shaposhnikov S., and Collins A.R. *Detection of oxidized DNA using DNA repair enzymes*. In: *The comet assay in Toxicology*. Edited by Alok Dhawan and Diana Anderson. RSC Publishing, 2009.
25. Collins A.R., Dusinska M., Franklin M. et al. *Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications*. Environmental and Molecular Mutagenesis 1997, 30:139-46.
26. Collins A.R. *The comet assay for DNA damage and repair. Principles, applications and limitations*. Molecular Biotechnology 2004, 26:249-261.
27. Azqueta A., Meier S., Priestley C. et al. *The influence of scoring method on variability in results obtained with the comet assay*. Mutagenesis 2011, 26:393-9.
28. Lovell D.P. and Omori T. *Statistical issues in the use of the comet assay*. Mutagenesis 2008, 23:171-82.
29. Ahnström G. and Erixon K. *Measurement of strand breaks by alkaline denaturation and hydroxyapatite chromatography*. In: *DNA Repair. A Laboratory Manual of Research Procedures*. Ed: Friedberg, E. C. and Hanawalt, P. C. 1981
30. Collins A.R., Azqueta A., Brunborg G. et al. *The comet assay: topical issues*. Mutagenesis 2008, 23:143-51.
31. Ersson C. and Möller L. *The effects on DNA migration of altering parameters in the comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments*. Mutagenesis 2011, 26:689-95.
32. Azqueta A., Gutzkow K.B., Brunborg G. et al. *Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions*. Mutation Research 2011, 724:41-5.
33. Ersson C., Möller P., Forchhammer L. et al. *An ECVAG inter-laboratory validation study of the comet assay: inter- and intra-laboratory variation of DNA strand breaks and FPG-sensitive sites in human mononuclear cells*. Mutagenesis 2013, 28:279-86.
34. Forchhammer L., Johansson C., Loft S. et al. *Variation in the measurement of DNA damage by comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial*. Mutagenesis 2010, 25:113-23.
35. Johansson C., Möller P., Forchhammer L. et al. *An ECVAG trial on assessment of oxidative damage to DNA measured by the comet assay*. Mutagenesis 2010, 25:125-32.
36. Forchhammer L., Ersson C., Loft S. et al. *Inter-laboratory variation in DNA damage using a standard comet assay protocol*. Mutagenesis 2012, 27:665-72.
37. ICH harmonised tripartite guideline S2 (R1). *Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use*. 2011. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.
38. Uhl M., Helma C., and Knasmüller S. *Single-cell gel electrophoresis assays with human-derived hepatoma (Hep G2) cells*. Mutation Research 1999, 441:215-24.
39. Hartmann A., Agurell E., Beevers C. et al. *Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay*. Mutagenesis 2003, 18:45-51.
40. Kirkland D. and Speit G. *Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens: III. Appropriate follow-up testing in vivo*. Mutation Research 2008, 654:114-32.
41. Cortés-Gutiérrez E.I., Dávila-Rodríguez M.I., Fernández J.L. et al. *New Application of the Comet Assay: Chromosome G₂ Comet Assay*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry 2011, 59:655-60.
42. Azqueta A., Shaposhnikov S., and Collins A.R. *DNA repair measured by the comet assay*. In: *DNA repair*. Edited by Inna Krumanisher. InTech, 2011.
43. Shaposhnikov S., Azqueta A., Henriksson S. et al. *Twelve-gel slide format optimised for comet assay and fluorescent in situ hybridisation*. Toxicology Letters 2010, 195:31-4.
44. Gutzkow K. B., Langleite T. M., Meier S. et al. *High throughput comet assay using 96 minigels*. Mutagenesis 2013, 28:333-40.
45. Azqueta A., Gutzkow K.B., Priestley C. et al. *A comparative performance test of standard, medium- and high-throughput comet assays*. Toxicology in Vitro 2013, 27:758-73.
46. McNamee J.P., McLean J.R.N., Ferrarotto C.L. et al. *Comet assay: rapid processing of multiple samples*. Mutation Research 2000, 466:63-9.
47. Stang A. and Witte I. *Performance of the comet assay in a high-throughput version*. Mutation Research 2009, 675:5-10.
48. Mercey E., Obeid P., Glaise D. et al. *The application of 3D micropatterning of agarose substrate for cell culture and in situ comet assays*. Biomaterials 2010, 31:3156-65.
49. Wood D.K., Weingeist D.M., Bhatia S.N. et al. *Single cell trapping and DNA damage analysis using microwell arrays*. Proceedings of the National Academy of Sciences 2010, 107:10008-13.
50. Shaposhnikov S., Salenko V.B., Brunborg G. et al. *Single-cell gel electrophoresis (the comet assay): Loops or fragments?* Electrophoresis 2008, 29:3005-12.
51. Shaposhnikov S., Larsson C., Henriksson S. et al. *Detection of Alu sequences and mtDNA in comets using padlock probes*. Mutagenesis 2006, 21:243-7.
52. Lorenzo Y., Costa S., Collins A.R. et al. *The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: Hedgehogs are not dead*. Mutagenesis, en imprenta.

TÚ TAMBIÉN
PUEDES SER
PARTE DE
LA SECAL
HAZTE SOCIO!

www.secal.es



Tecnología High-content screening (HCS) para la determinación del potencial hepatotóxico

Laia Tolosa¹, M. Teresa Donato^{1,2,3}, José V. Castell^{1,2,3} y M. José Gómez-Lechón^{1,2}

¹Unidad de Hepatología Experimental. Instituto de Investigación Hospital La Fe (IIS La Fe). Valencia

²CIBERehd, FIS, Barcelona

³Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia

INTRODUCCIÓN

La hepatotoxicidad es la principal causa de retirada de fármacos en las fases preclínicas y clínicas del desarrollo, incluso tras su comercialización (Kaplowitz, 2001; Lee, 2003). Se han implicado múltiples mecanismos en la hepatotoxicidad inducida por fármacos, así como en la forma en que se afectan los orgánulos intracelulares que define el perfil del daño hepático.

Los ensayos de citotoxicidad estándar *in vitro* presentan una baja concordancia con la hepatotoxicidad humana, lo que hace que la predicción de la hepatotoxicidad sea difícil. Los ensayos tradicionales de toxicidad muestran menos del 20% de sensibilidad para la detección del potencial hepatotóxico de los xenobióticos en el hombre (O'Brien *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2004). Estos métodos se basan en la determinación de un único punto final, aunque la hepatotoxicidad puede ser el resultado de múltiples mecanismos y por ello, con frecuencia no son lo suficientemente sensibles para detectar el daño hepático. En cambio, las estrategias multiparamétricas consisten en la evaluación de varios parámetros que cubren un rango amplio de funciones celulares y permiten con mayor fiabilidad identificar compuestos potencialmente hepatotóxicos. Se han desarrollado varios ensayos multiparamétricos para evaluar la toxicidad de xenobióticos basados en técnicas de análisis de imagen de alto contenido (*high content screening*, HCS) (O'Brien *et al.*, 2006; Abraham *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2004). Nuestro laboratorio ha desarrollado uno de estos ensayos en el que se realiza el análisis a nivel de células individuales evaluando

diferentes parámetros funcionales a la vez en las mismas células mediante la utilización combinada de sondas fluorescentes. Ello permite la detección de efectos que pueden ser el resultado de distintos mecanismos de toxicidad, así como determinar el principal(es) mecanismo(s) mediante los que induce su efecto tóxico. Estas estrategias han demostrado una mayor sensibilidad y predictividad que los ensayos tradicionales de un solo punto final y pueden desempeñar un papel clave no sólo para el cribado y la detección de la toxicidad de los xenobióticos, sino también para la clasificación de los compuestos en base a los patrones de inducción del daño celular (O'Brien *et al.*, 2006; Abraham *et al.*, 2008).

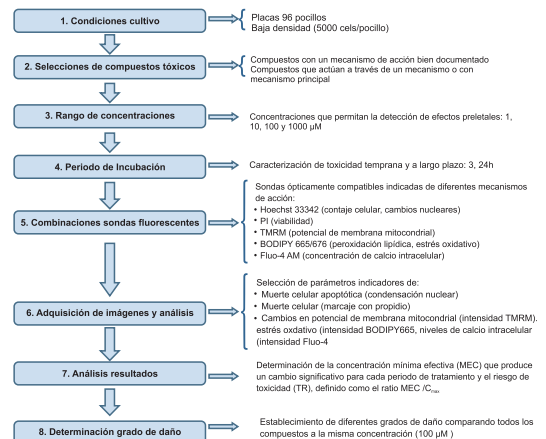


Figura 1: Esquema del ensayo multiparamétrico de toxicidad. Se detallan los pasos seguidos en el desarrollo de un ensayo multiparamétrico para detectar el potencial hepatotóxico y los mecanismos implicados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de la línea celular HepG2

Las células HepG2 se cultivaron en medio F-12/Leibovitz (1:1 v/v) (suplementado con 7% de suero bovino fetal, 50 U penicilina/ml y 50 µg estreptomycin/ml). Para subcultivarlas, las células se levantaron con tripsina/EDTA a 37°C.

Incubación con los compuestos problema

Las células HepG2 se sembraron a una densidad de 5000 células/ml en placas de 96 pocillos y se dejaron crecer y equilibrar durante 24 h. Las células se expusieron durante 3 o 24 h a cuatro concentraciones de los compuestos (1, 10, 100 y 1000 µM). Cuando la concentración de 1000 µM no se pudo alcanzar debido al límite de solubilidad en el medio de cultivo, se usó la máxima concentración posible. Cada condición experimental se ensayó en pocillos triplicados. Las soluciones stock se prepararon en DMSO y se diluyeron convenientemente en el medio de cultivo para obtener las concentraciones finales deseadas. La concentración final de DMSO en el medio de cultivo nunca excedió el 0.5% (v/v) y los cultivos control se trataron con la misma cantidad de solvente.

Ensayo de análisis de imagen de alto contenido

La hepatotoxicidad de los compuestos testados se determinó mediante incubación con sondas fluorescentes y el posterior análisis de imagen de alto contenido que incluyó los siguientes puntos finales: viabilidad celular (yoduro de propidio, PI), cambios morfológicos nucleares (Hoechst 33342), peroxidación lipídica (BODIPY 665/676), alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial (TMRM) y en la concentración intracelular de calcio (Fluo-4 AM).

Después del tratamiento, las células se marcaron simultáneamente con 1.5 µg/ml Hoechst 33342, 1.5 µg/ml PI, 75 ng/ml TMRM, 0.27 µg/ml Fluo-4 AM y 1.5 µg/ml BODIPY665/676. Después de 30 min de incubación a 37°C, se adquirieron imágenes usando el sistema Scan[^]R (Olympus). Se adquirieron 9 campos

por pocillo con el objetivo 10X para cada uno de los canales de fluorescencia utilizados. Las sondas se excitaron y su fluorescencia se monitorizó a las longitudes de onda de excitación y emisión adecuadas utilizando los filtros apropiados para cada caso. En la puesta a punto del proceso se ajustaron los tiempos de exposición para evitar solapamientos entre las distintas sondas. Se seleccionaron sondas ópticamente compatibles. Las imágenes se analizaron utilizando el módulo de análisis del Scan[^]R, que permite la cuantificación simultánea de diferentes subestructuras que se marcan con las diferentes sondas fluorescentes y medir la intensidad de fluorescencia asociada con los compartimentos nuclear o citoplasmático.

RESULTADOS

Ensayo multiparamétrico de hepatotoxicidad

El ensayo completo realizado para el cribado de la hepatotoxicidad inducida por compuestos y los mecanismos implicados se resumen en la Figura 1. Inicialmente, se seleccionaron sondas ópticamente compatibles que permitieran detectar diferentes cambios/mecanismos implicados en la toxicidad (Figura 2). Hasta 50 parámetros distintos pueden medirse en las mismas células usando el ensayo multiparamétrico descrito mediante el uso de 5 sondas fluorescentes diferentes. Después de un análisis inicial, se eligieron aquellos que permitían cubrir un amplio espectro de mecanismos implicados en la toxicidad. Los parámetros finalmente seleccionados fueron: viabilidad celular (obtenido a partir del número de células vivas en cada condición), cambios morfológicos nucleares (obtenido a partir de los datos sobre la textura y compactación del núcleo), potencial de membrana mitocondrial (intensidad de fluorescencia TMRM), la concentración intracelular de calcio (calculada a partir de la fluorescencia de Fluo-4 AM) y el estrés oxidativo (estimado como la peroxidación lipídica obtenida a partir de la cuantificación de la fluorescencia de BODIPY665/676). A continuación se testaron 78 compuestos a 4 concentraciones fijas y durante 2 periodos de incubación (1 y 24 h).

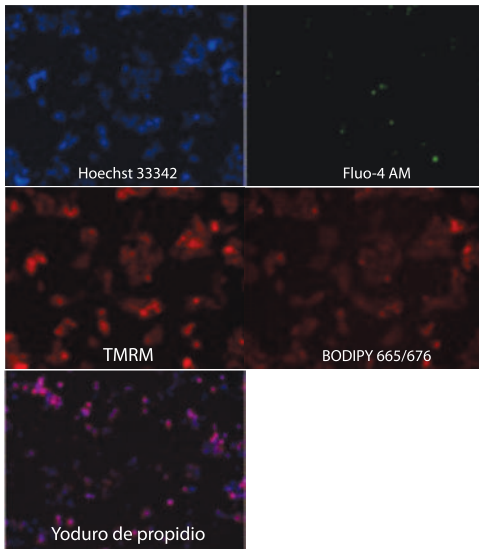


Figura 2: Sondas fluorescentes para el estudio de la hepatotoxicidad inducida por fármacos. Se eligieron 5 sondas fluorescentes diferentes ópticamente compatibles y que permiten marcar los núcleos y detectar cambios nucleares debido a la inducción de la apoptosis (Hoechst 33342), determinar la viabilidad celular (yoduro de propidio), cuantificar cambios en la concentración de calcio intracelular (Fluo-4 AM), así como detectar cambios en el potencial de membrana mitocondrial (TMRM) o en la peroxidación lipídica como resultado de un incremento del estrés oxidativo (BODIPY665/676)

Clasificación de los compuestos según su mecanismo de acción

En la Figura 3 se muestran imágenes representativas de células sin tratar (control) y aquellas tratadas con diferentes concentraciones de rotenona, un compuesto descrito como potente tóxico mitocondrial (Donato *et al.*, 2012). En la imagen se muestra una pérdida significativa de la fluorescencia para TMRM incluso a la concentración más baja utilizada (1 μM), lo que indicaría la despolarización de la membrana mitocondrial. Además se observa un efecto significativo del compuesto en la viabilidad celular.

El ensayo multiparamétrico desarrollado también permite detectar la peroxidación lipídica como medida del estrés oxidativo. En la Figura 4 se muestran células control y tratadas con diferentes concen-

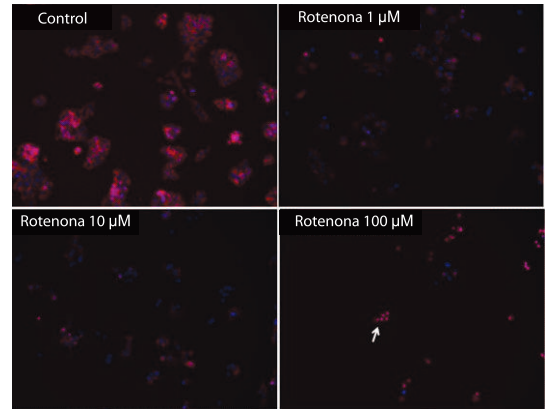


Figura 3: Efecto de la rotenona en el potencial de membrana mitocondrial tras 24 h de exposición. La línea celular HepG2 se expuso a diferentes concentraciones de rotenona (1-100 μM) y se estudiaron los mecanismos implicados en su toxicidad. En las imágenes representativas se observa una considerable disminución del potencial de membrana mitocondrial (pérdida de fluorescencia roja, TMRM) y una significativa disminución de la viabilidad celular (flecha blanca). Los núcleos se muestran en azul (Hoechst 33342)

traciones (1-100 μM) de tert-butil hidroperóxido. Se muestra la inducción de estrés oxidativo (pérdida de fluorescencia BODIPY 665/676).

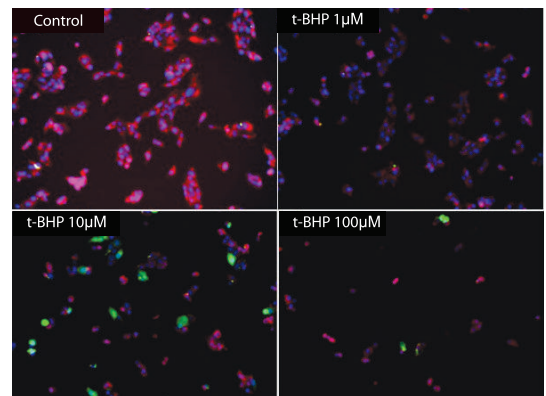


Figura 4: Efectos del tert-butil hidroperóxido en el estrés oxidativo y la concentración de calcio intracelular. La línea celular HepG2 se expuso a diferentes concentraciones de tert-butil hidroperóxido (t-BHP, 1-100 μM) y se estudiaron los mecanismos implicados en su toxicidad. En las imágenes representativas se observa el efecto del t-BHP en la peroxidación lipídica (pérdida de fluorescencia roja, BODIPY 665/676) e incremento significativo de la concentración intracelular de calcio (verde, Fluo-4 AM). Los núcleos se muestran en azul (Hoechst 33342)

La homeostasis del calcio se altera en respuesta a diferentes daños celulares. Aunque no es específico de un mecanismo particular, el incremento del calcio intracelular es un indicador de los efectos deletéreos en las células. Por esta razón, se incluyó en el ensayo multiparamétrico de toxicidad y se detectaron cambios significativos tras el tratamiento con varios compuestos, como por ejemplo tamoxifen, lovastatin o tert-butil hidropéroxido (Figura 4).

Por otra parte, en cuanto a los cambios a nivel nuclear, el etopósido y el captopril, conocidos por producir la muerte celular por apoptosis, inducen cambios morfológicos nucleares significativos

Determinación del grado de daño celular

Con el objetivo de comparar isomolarmente el grado de daño celular inducido por los compuestos testados, se compararon los diferentes efectos de los compuestos a la misma concentración (100 μ M). Se crearon puntuaciones estadísticamente diferentes en base al nivel de alteración para cada uno de los parámetros analizados. Posteriormente, se calculó la suma de todos los valores para cada parámetro y periodo de incubación (Tabla 1). Por ejemplo, el tamoxifeno puede ser definido como un compuesto que produce un daño severo, la aflatoxina B1 podría definirse como inductora de un daño moderado y el cloranfenicol produce poco daño.

DISCUSIÓN

La industria farmacéutica está enormemente interesada en establecer sistemas de cribado y modelos mecanísticos para detectar la hepatotoxicidad de manera temprana en el proceso de desarrollo de nuevos fármacos (Suter, 2006). Mediante la combinación de un modelo bien definido (línea celular humana derivada de hígado HepG2) y la tecnología de análisis de imagen de alto contenido, hemos desarrollado una aproximación *in vitro* que es capaz de identificar muchos compuestos hepatotóxicos y describir los mecanismos implicados en su toxicidad. Una de las principales ventajas del sistema es su rapidez (una sola incubación con una

combinación apropiada de sondas fluorescentes) y el uso de células adheridas que permite detectar cambios morfológicos.

Se fijaron 4 concentraciones para cubrir un amplio rango que permitiera detectar cambios significativos inducidos por los compuestos. De hecho, usando la concentración 100 μ M, el 79% de los compuestos testados fueron identificados como hepatotóxicos. Aunque sabemos que los valores de IC50 para estos compuestos varían significativamente, el objetivo era crear un sistema estandarizado para el cribado preclínico de nuevos fármacos de los que no hay información farmacológica; por tanto, un rango fijo de concentraciones podría permitirnos comparar un compuesto desconocido con aquellos compuestos de los que tenemos información mecanística y sobre el grado de daño (O'Brien *et al.*, 2006, Abraham *et al.*, 2008).

Tabla 1: Grado de daño después de analizar los compuestos a la concentración 100 μ M para cada parámetro, compuesto y periodo de incubación.

Nivel Daño	Compuesto
No tóxico	Acetaminofeno, amikacina, ácido ascórbico, bupropion, cafeína, citrato, ciclofosfamida, diclofenaco, doxiciclina, galactosamina, malatión, metotrexato, fenobarbital, fentoína, estavudina, tioacetamida, warfarina.
Toxicidad baja	2,4-dinitrofenol, 2-nitrofluoreno, ácido acetilsalicílico, amitriptilina, atropina, azatioprina, captopril, carbamecepin, cloramfenicol, didanosido, fenofibrato, fialuridina, glicochenodeoxicolato, isoniazida, cloruro de mercurio II, NNK, orfenadrina, pentachlorofenol, rifampicina, valproato, taurolitolcolato, tetraciclina, ticlopidina, troglitazona, verapamilo, zidovudina.
Toxicidad moderada	17- α -etinilestradiol, aflatoxina B1, clozapina, 8colchicina, cumene hidroperóxido, cicloheximida, ciclosporina A, digoxina, eritromicina, etopósido, flutamida, lovastatina, menadiona, paraquat, piperonil butóxido, simvastatina, tilorona.
Toxicidad alta	Amiodarona, cloroquina, clorpromazina, fluoxetina, imipramina, maprotilina, rotenona, tamoxifeno, t-butil hidroperóxido.

El sistema descrito permite la detección de fenómenos tempranos en el proceso hepatotóxico así como identificar los mecanismos implicados. El test identifica de manera satisfactoria cambios en el potencial de membrana mitocondrial, en la

concentración de calcio intracelular y el estrés oxidativo, así como la inducción de apoptosis.

En resumen, hemos desarrollado un sistema que permite un cribado de compuestos sencillo que indica tanto los mecanismos implicados en la toxicidad como su nivel de daño. La tecnología de análisis de imagen descrita permite identificar los mecanismos implicados en la toxicidad y podría ser usada como herramienta de priorización en el desarrollo de fármacos, ya que presenta una alta especificidad y podría ser adaptada a otros tipos celulares y/u otras

Bibliografía

-Abraham V. C., Towne D. L., Waring J. F., Warrior U., and Burns D. J. *Application of a high-content multiparameter cytotoxicity assay to prioritize compounds based on toxicity potential in humans.* J Biomol Screen 2008, 13: 527-37.

-Donato M. T., Tolosa L., Jiménez N., Castell J.V., and Gómez-Lechón M.J. *High-Content Imaging Technology for the Evaluation of Drug-Induced Steatosis Using a Multiparametric Cell-Based Assay.* J Biomol Screen 2012, 17(3): 394-400.

-Kaplowitz N. *Drug-induced liver disorders: implications for drug development and regulation.* Drug Saf 2001, 24: 483-90.

-Lee W. M. *Drug-induced hepatotoxicity.* N Engl J Med 2003, 349: 474-85.

-O'Brien P. J., Irwin W., Diaz D., Howard-Cofield E., Krejsa C. M., Slaughter M. R., Gao B., Kaludercic N., Angeline A., Bernardi P., Brain P., and Hougham, C. *High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with in vitro cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening.* Arch Toxicol 2006, 80: 580-604.

-Suter W. *Predictive value of in vitro safety studies.* Curr Opin Chem Biol 2006, 10: 362-6.

-Xu J. J., Diaz D., and O'Brien P. J. *Applications of cytotoxicity assays and pre-lethal mechanistic assays for assessment of human hepatotoxicity potential.* Chem Biol Interact 2004, 150: 115-28.



Fuente: Concurso de Fotografía SECAL

TÚ TAMBIÉN
PUEDES SER
PARTE DE
LA SECAL
HAZTE SOCIO!

www.secal.es

SECAL sociedad española
para las ciencias
del animal de laboratorio

Técnicas de trazado en la rata albina

Alicia Mohedano Moriano¹ y Antonio Viñuela Sánchez²

¹Facultad de Medicina de Albacete. UCLM

²Universidad de Salamanca

INTRODUCCIÓN

La neuroanatomía ha resultado ser uno de los pilares básicos para entender cómo funcionan y se relacionan las diferentes partes del cerebro. Esta rama de la ciencia no sólo estudia la estructura de las distintas áreas o núcleos cerebrales, sino también las conexiones que se establecen entre ellos. Actualmente, la mayor parte de los estudios de conectividad entre áreas del cerebro se basan en técnicas de trazado axonal. Se definen como trazadores neuronales las moléculas que tras su inyección intracerebral son captadas por las neuronas y transportadas retrógrada o anterógradamente a través de las prolongaciones nerviosas. Estos estudios hacen uso de modelos animales; por lo tanto, el principal paso de esta técnica es establecer un objetivo de estudio: ¿Qué región del cerebro quiero estudiar? ¿Qué especie se va a utilizar? ¿Qué trazadores se van a escoger? ¿Cuál es el abordaje quirúrgico?

Especie

La técnica de trazado exige el empleo de animales como modelos de experimentación. Para el estudio de las diferentes áreas del cerebro, es necesario seleccionar el modelo animal adecuado, que depende de la especie y la cepa. Por ejemplo, si quisiéramos estudiar la conectividad de la parte rostral del lóbulo temporal, los primates humanos y no humanos son los únicos que presentan un lóbulo temporal anatómicamente diferenciado. Aunque otras especies, como los roedores, poseen una corteza temporal, el desarrollo del lóbulo temporal en los primates alcanza un nivel muy superior al de cualquier otro taxón (Figura 1). Por lo tanto, el modelo idóneo serían los primates no humanos.



► Fuente: Concurso de Fotografía SECAL

En otras ocasiones, la elección de la especie viene marcada por el uso de determinados neurotrazadores, tales como los virus neurotrópicos, cuya efectividad va a depender del modelo animal escogido. Por ejemplo, el virus de la pseudorabia afecta a roedores, pero no es efectivo en primates. Por lo tanto, la parte fundamental del éxito del diseño experimental depende del modelo animal (especie, cepa e incluso de la calidad de vida del animal).

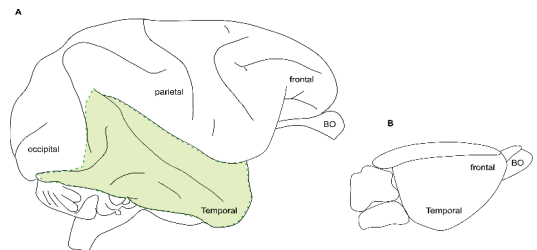


Figura 1: Esquema de vista lateral de un cerebro de *Macaca reshus* (A) y rata albina (B). La línea discontinua de color verde marca el límite del lóbulo temporal en el *Macaca reshus*. BO: Bulbo olfatorio

Trazadores

Los neurotrazadores se pueden clasificar en unidireccionales y bidireccionales. Los unidireccionales pueden ser: retrógrados (captados por el axón y transportados hacia el soma y las dendritas) y anterógrados (captados por el soma y dendritas y transportados hacia el axón). Los trazadores bidireccionales actúan como retrógrados y/o anterógrados, dependiendo de su peso molecular (Figura 2).

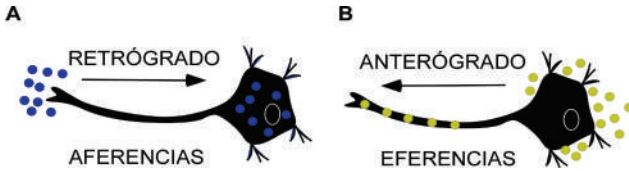


Figura 2: Representación esquemática del transporte retrógrado o anterógrado a través de las prolongaciones nerviosas. A) moléculas de trazador retrógrado (azul) captado por el axón y transportado hacia el soma. B) moléculas de trazador anterógrado (amarillo) captados por el soma y dendritas y transportados hacia el axón

Existen gran variedad de neurotrazadores. Estas sustancias orgánicas pueden estar asociadas a un fluorocromo (fluorescentes), aminoácidos tritiados (radiactivos), aminodextranos biotinilados (asociado a una molécula de biotina), *Phaseolus vulgaris*-leucoaglutinina (lecitina biotinizada) y trazador retrógrado con gel de peroxidasa.

Todos estos trazadores permiten visualizar tanto las aferencias (es decir, qué áreas del cerebro proyectan al lugar de inyección) como las eferencias (las salidas o proyecciones del lugar de inyección). Por lo tanto, permiten ver proyecciones directas, neuronas de primer orden dentro del sistema nervioso central; no saltan sinapsis. Actualmente, se están utilizando virus neurotrópicos (virus que afectan al sistema nervioso) como trazadores, como el virus de la rabia, herpes simples y pseudorabia. Estos trazadores saltan sinapsis y permiten visualizar circuitos. La desventaja de éstos es que para su visualización se requiere el sacrificio del animal. Además, en el caso de los virus neurotrópicos, se necesitan instalaciones con alto nivel de bioseguridad. En este momento, se está ahondando en la utilización de trazadores *in vivo* tales como el manganeso (trazador anterógrado) que se visualiza en resonancia magnética, y que aunque la resolución espacial es baja, no conlleva el sacrificio del animal (Pautler y cols., 2003).

El criterio para usar un trazador u otro dependerá, por un lado, del objetivo de estudio (visualizar conexiones aferentes o eferentes, usando trazadores retrógrados o anterógrados respectivamente), y por otro, de la velocidad de metabolización del trazador y el transporte del trazador (si recorren largas distancias o cortas) que determinarán los periodos de super-

vivencias de los animales. Otro punto a considerar es la retención dentro de la célula o si difunden, ya que si se mantiene más tiempo dentro de las neuronas minimiza el riesgo de falsos positivos. Respecto a los trazadores fluorescentes, otro factor importante es la luz de excitación y emisión y la coloración para poder combinar unos trazadores u otros dentro de nuestro estudio.

Por otro lado, hay que tener en cuenta que aunque los aminodextranos marcados con biotina y los aminoácidos tritiados se describieron como sustancias capaces de transportarse fundamentalmente desde el axón hasta el soma, en ocasiones adoptan la dirección contraria. Los aminodextranos anterógrados pueden comportarse retrógradamente bajo algunas circunstancias, apareciendo somas marcadas. Esto puede dificultar la interpretación del origen de las fibras y el marcaje terminal, ya que éste puede originarse o bien en el lugar de inyección, o en las neuronas marcadas retrógradamente. Aunque esto es frecuente en cerebros de mamíferos y aves, en primates apenas se marcan neuronas retrógradamente cuando se utilizan aminodextranos de 10 KDa de peso molecular. Estos trazadores funcionan principalmente de manera anterógrada, son muy sensibles y marcan perfectamente la fibras terminales (Veenman y cols., 1992; Reiner y cols., 2000; Smith y cols., 1998). Respecto a los aminoácidos tritiados (Cowan y cols., 1972), éstos son menos sensibles que los anteriores ya que, debido a su pequeño peso molecular, son más difusibles y, por otro lado, las inyecciones que producen son normalmente más grandes, lo que puede conllevar falsos positivos.

La efectividad de los virus neurotrópicos depende de la especie, de la edad, de la dosis, de la forma de inoculación, virulencia y de la velocidad de propagación; esta última depende del ciclo viral (replicación). Si el área de estudio está próxima al sistema ventricular, difunde y se corre el riesgo de falsos positivos. Además, se puede producir degeneración celular de las neuronas de primer orden, respuesta inflamatoria y cambios metabólicos. Por otro lado, se necesitan niveles de bioseguridad L2 (Kelly y Strick, 2000; Chen y cols., 1999).

Por lo tanto, a la hora de escoger un trazador hay que hacer un estudio bibliográfico previo.

Aplicación de un trazador

Los trazadores se pueden inyectar por presión. El trazador se aplica a la región cerebral de interés mediante una jeringuilla (Hamilton) o por inyección iontoforética. La inyección iontoforética requiere la disolución de los trazadores en solventes orgánicos y mediante pulsos eléctricos, son liberados en la zona de cerebro de interés.

Tanto por inyección con jeringuilla como por iontoforesis, el trazador se libera al tejido y éste se difunde en la membrana plasmática o se acumula en el citosol dependiendo de su carga eléctrica.

TÉCNICAS DE TRAZADO POR IONTOFORESIS EN RATA ALBINA

Esta técnica nos permite conocer las conexiones neuronales a larga distancia, usando neurotrazadores que se inyectan intracerebralmente y se liberan mediante corrientes eléctricas (iontoforesis).

Coordenadas quirúrgicas

La estereotaxia sirve para localizar de forma muy precisa cualquier estructura o núcleo del cerebro. El aparato estereotáxico permite inmovilizar la cabeza del animal y situar un punto particular en el espacio a partir de tres ejes.

Para calcular las coordenadas estereotáxicas se usa como referencia el atlas del cerebro de la rata de Paxinos y Watson (1998); este atlas es una seriación de cortes coronales que muestran la posición espacial de cada núcleo o estructura del cerebro. El cálculo de las coordenadas se realiza localizando el lugar de inyección en los tres ejes del espacio (rostro-caudal, latero-medial y dorso-ventral).

Para determinar el lugar de inyección en el eje rostro-caudal (eje Z) se localiza la lámina del atlas en la que se encuentra el núcleo de interés (visión coronal, ver Figura 3). En esta lámina se observan dos puntos de referencia: Bregma (nombre que se da al punto de unión de la sutura sagital con la sutura fronto-parietal

del cráneo en el plano coronal) o la línea interaural (marcada por las barras auriculares del esterotáxico cuando se introduce en los meatos auditivos). Se utiliza la referencia de Bregma para estructuras o núcleos del cerebro en una posición anatómica rostral y la interaural para estructuras o núcleos caudales (Paxinos y cols., 1985). Además, los valores de estas referencias pueden ser positivos o negativos, e indican si el lugar de inyección está por delante o por detrás del punto de referencia (Bregma o interaural).

La coordenada latero-medial (eje de abscisa) muestra la distancia que hay desde la línea media (seno sagital superior) hasta el lugar de interés; en cambio, la coordenada dorso-ventral (eje de ordenada) muestra la profundidad, la distancia desde la superficie cortical hasta el lugar de inyección (ver Figura 3).

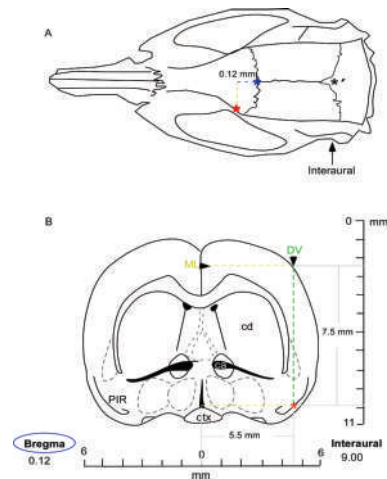


Figura 3: A) Dibujo esquemático de un cráneo de rata. El asterisco de color negro representa Bregma (punto de referencia para las estructuras rostrales del cerebro); el asterisco *^o corresponde a Lambda (unión de las suturas sagital y lambdaoidea) y la línea interaural (punto de referencia para estructuras caudales del cerebro). El asterisco rojo representa el lugar de inyección (corteza piriforme), el lugar de interés se localiza 0.12 mm por delante de Bregma. B) Representación de un corte coronal del cerebro rata del atlas estereotáxico. El asterisco de color rojo representa el lugar de inyección (corteza piriforme). La línea discontinua de color verde representa la distancia entre la superficie cortical y el punto de interés (coordenadas dorso-ventral, 7,5 mm). La línea discontinua de color amarillo representa la distancia desde la línea media hasta el lugar de interés (coordenada latero-medial, 5,5 mm) y finalmente, la coordenada rostro-caudal (color azul) corresponde a 0.12 mm de Bregma

Preparación del animal

Se procede a la anestesia del animal con una combinación de Ketamina (75mg/Kg) y Xilacina (10mg/Kg) por vía intraperitoneal y en la misma jeringuilla. Después, se acomoda al animal en una cámara calefactora para evitar las pérdidas de calor y la hipotermia. Una vez alcanzado el nivel de anestesia adecuado (pérdida del reflejos: retracción de la pata trasera en respuesta al pinzamiento de la almohadilla plantar, reflejo corneal o de pinzamiento de la cola), se procede al rasurado del animal en la región craneal, mediante maquinilla de afeitar. Se le aplica un humectante ocular (carbómero) para no perder la lubricación ocular durante la cirugía. A continuación, se coloca en decúbito prono, en el aparato estereotáxico Koff con las extremidades extendidas. Se fija la cabeza del animal por dos puntos: conductos auditivos y paladar. Se puede observar el micromanipulador con la micropipeta.

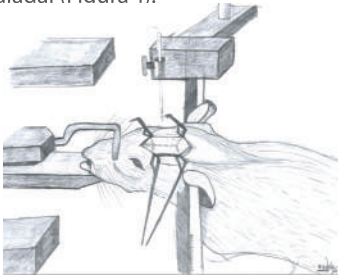


Figura 4: Esquema de la cirugía estereotáxica. Animal colocado en decúbito prono, en el aparato estereotáxico Koff con las extremidades extendidas. La cabeza del sujeto fijada por dos puntos: conductos auditivos y paladar. Incisión longitudinal de la piel de la cabeza, dejando visible las suturas del cráneo de la rata. Se puede observar el micromanipulador con la micropipeta.

Abordaje quirúrgico

Toda la intervención quirúrgica tiene lugar en un quirófano experimental bajo medidas asépticas. Se empieza con la limpieza de la zona a operar con povidona yodada. A continuación, la intervención se inicia con una incisión longitudinal amplia de la piel en la línea media. Esta piel es reclinada, sujetada con pinzas Halstead-mosquitos y cubierta con una gasa húmeda. Se retira el periostio con un desperiostizador, dejando visibles las suturas del cráneo de la rata (Figura 4). Con el micromanipulador del aparato

estereotáxico nos desplazamos a la zona de interés, utilizando las coordenadas rostro-caudal, latero-medial y dorso-ventral calculadas previamente. Esto permite marcar sobre el cráneo el lugar de interés y realizar una craniectomía no superior a 0.5 cm con una fresa dental. Una vez expuesta la capa menígea de la duramadre, ésta se incidirá hasta exponer la superficie cortical. Se ajustan de nuevo las coordenadas del lugar del inyección y se introduce una micropipeta de vidrio cargada de trazador con un diámetro aproximado de 30-70 μm y acoplada a un sistema de iontoforesis (corriente positiva y alterna 7 pulsos on /7 off, durante 7 a 10 minutos). Una vez finalizada la inyección, se eleva la punta unas 200 μm y se guarda un periodo de reposo de 5 minutos para evitar el reflujo del trazador; pasado este tiempo se procede a retirar la micropipeta. Finalmente, se cierra por planos con puntos de seda y se le administra analgesia (buprenorfina).

Una vez realizada la intervención quirúrgica, los animales se colocan en una cámara calefactora hasta que recuperen los reflejos de retracción de la pata trasera en respuesta al pinzamiento de la almohadilla plantar o comiencen a incorporarse para ser devueltos a sus jaulas, bajo supervisión veterinaria.

Biografía

- Amaral D.G., Insausti R., and Cowan W.M. The entorhinal cortex of the monkey: I. Cytoarchitectonic organization. *J. Comp. Neurol.* 1987, 264(3):326-55.
- Cheng S., Yang M., Miselis R.R., et al. Characterization of transsynaptic tracing with central application of pseudorabies virus. *Brain Res.* 1999, 838: 171-83.
- Kelly R.M. and Strick P.L. Rabies as a transneuronal tracer of circuits in the central nervous system. *J. Neurosci. Methods* 2000, 103(1):63-71.
- Paxinos G., Watson C., Pennisi M., et al. Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight. *J. Neurosci. Methods* 1985, 13(2):139-43.
- Paxinos G. and Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press 1998.
- Pautler R.G., Mongeau R., and Jacobs R.E. In vivo trans-synaptic tract tracing from the murine striatum and amygdala utilizing manganese enhanced MRI (MEMRI). *Magn. Reson. Med.* 2003, 50(1):33-9.
- Reiner A., Veenman C. L., Medina L., et al. Pathway tracing using biotinylated dextran amines. *J. Neurosci Methods* 2000, 103:23-37.
- Smith Y., Bevan M.D., Shink E., et al. Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience* 1998, 86(2):353-87.
- Veenman C.L., Reiner A., and Honig M.G. Biotinylated dextran amine as an anterograde tracer for single- and double-labeling studies. *J. Neurosci Methods* 1992, 41(3):239-54.



► Fuente: Concurso de Fotografía SECAL

El modelo animal en el proceso de investigación

Cristina Gerbolés

Técnico Dep. Functional Pharmacology,
Draconis Pharma, S.L

A lo largo de la historia, se ha utilizado la experimentación con animales para lograr avances médicos y científicos. Uno de los objetivos principales es conocer los efectos que diferentes sustancias o procedimientos pueden tener en el ser humano, y en parte es por esto que la experimentación con animales genera mucha controversia. Hay quienes opinan que dicho objetivo no se debe conseguir a través del sufrimiento de otro ser; sin embargo, otros opinan que es justificable, si se demuestra el beneficio que puede suponer para el ser humano u otros animales.

Gran parte de los avances de la medicina de este siglo han sido posibles gracias a la investigación tanto básica como aplicada. La experimentación animal ha contribuido crucialmente al desarrollo y al avance en Ciencia, como así lo atestiguan más de la mitad de los Premios Nobel de Fisiología o Medicina, pues en todos ellos la investigación con modelos animales ha jugado un papel preponderante. Durante más de un siglo, prácticamente cada logro médico ha dependido directa o indirectamente de la investigación con animales.

¿Por qué se utilizan animales?

La observación de los animales ha sido imprescindible para el conocimiento de la organización de los seres vivos, así como de las propiedades de las sustancias de posible aplicación en ellos, sus mecanismos y lugares de acción. Los

animales de laboratorio tienen órganos y sistemas similares a los humanos y en muchos casos, son susceptibles a las mismas enfermedades, lo que permite aplicar los datos obtenidos de la investigación a humanos y a otros animales.

Por otro lado, y por razones éticas, antes de administrar un nuevo fármaco a un voluntario humano, se debe tener la seguridad de que no causará ningún daño y asegurar que el nuevo fármaco va a ser terapia eficaz para tratar la enfermedad en cuestión. Estas pruebas de seguridad y eficacia son la base del desarrollo de nuevos fármacos. La manera de poder asegurar que un nuevo medicamento es seguro y eficaz es entender cómo se comporta en un sistema vivo, y esto sólo puede obtenerse a partir de estudios en animales. De todos modos, estos estudios representan sólo entre el 5 al 10% del proceso de investigación¹.

El proceso de desarrollo de un medicamento no se inicia con la investigación animal. Sólo se lleva a cabo cuando se considera necesario para responder a una pregunta científica específica, cuya respuesta no se puede encontrar a través de otras vías.

¿Qué tipo de animales se utilizan en la investigación?

Existen varios modelos animales: perros, gatos, conejos, ovejas, cerdos, peces, ranas, aves, primates no humanos, u otros tipos de animales, dependiendo del tipo de investigación; en conjunto representan menos del 10% de los animales utilizados².

Presión Positiva

Los modelos más utilizados son los de roedores que suman más del 90%, debido a que tienen un tamaño pequeño, son fáciles de manejar, y tienen gran cantidad de crías en un corto período de tiempo. De entre los roedores, el ratón, tiene como valor añadido, la gran similitud de su genoma con el humano. El ratón tiene características anatómicas y fisiológicas similares al humano, compartiendo el 95% de los genes³. Esto ha permitido identificar multitud de genes relacionados con el cáncer, la obesidad, la diabetes y muchas otras patologías en ambas especies; pero la clave ha sido la secuenciación completa de ambos genomas, que ha permitido empezar a estudiar enfermedades genéticas humanas mediante modelos murinos.

Un modelo revolucionario

En la historia de la investigación se han usado diversos modelos animales, pero a principios del siglo XX, supuso un gran hito la generación de ratones consanguíneos por el Dr. Charles Little. La primera cepa de ratones idénticos genéticamente, la DBA⁴, permitió por primera vez en la historia realizar experimentos sin que las diferencias genéticas entre individuos pudieran invalidar los resultados; esto supuso un gran avance para las investigaciones inmunológicas, los trasplantes de órganos, la susceptibilidad al cáncer y, por supuesto, para los estudios genéticos.

Modelo para enfermedades y terapias

Existen diversas maneras de generar ratones genéticamente modificados, así, existen ratones transgénicos que son aquellos en los que se introduce un gen que no pertenece a su genoma (transgén), así como los conocidos ratones "knock in" y "knock out". En cualquier caso, lo esperado es que a través de la modificación deseada en el genoma, se puedan recapitular ciertas características fenotípicas que permitan validar un modelo murino.

Los genes incorporados en los ratones transgénicos pueden ser para determinar la homología de los genes entre dos especies u otorgar una nueva propiedad como puede ser la

bioluminiscencia que permite estudiar la fisiología del animal "in vivo". Los ratones transgénicos, además de usarse para reproducir ("modelar") enfermedades, también se utilizan para estudiar la aplicación de posibles terapias como la regeneración de tejidos y creación de terapias contra las células cancerígenas⁵ por ejemplo, entre otras muchas. Por otra parte, los ratones *knock-out* se utilizan para conocer la función de un gen de interés y permiten producir modelos animales de una enfermedad producida por la falta de un gen.

Otro gran descubrimiento fue la puesta en escena de los ratones nude y atímicos, con una mutación espontánea que los presentó con ausencia de pelo y además, con la particularidad de ser inmunodeficientes, hecho que los hizo sumamente útiles para el estudio de patologías de alteraciones del sistema inmune. El hecho de que este tipo de ratón acepte el trasplante de tumores humanos ha sido uno de los descubrimientos más importantes, y ha supuesto un punto de inflexión sumamente importante para la investigación del cáncer.

Avances desarrollados gracias a la experimentación animal

Desde el desarrollo de la vacuna contra la polio hasta la ingeniería genética, la utilización de animales de laboratorio ha sido esencial. *Von Behring* utilizando cobayos obtuvo anticuerpos contra la difteria; *Ross* utilizó pichones para comprender el ciclo vital de la malaria; *Pavlov*, utilizando perros proporcionó las bases para los estudios de las respuestas condicionadas. Los estudios sobre el bacilo de la tuberculosis realizados por *Koch* fueron hechos en carneros y vacas, y en los estudios sobre la anatomía neuronal realizados por *Cajal* y *Golgi*, se utilizaron perros y caballos.

Las suturas de los vasos sanguíneos y los injertos fueron estudiados por *Carrel* en perro. *Richet* estudió los mecanismos de la anafilaxia utilizando conejos y perros, para esclarecer los mecanismos de la inmunidad. Los estudios que dieron como resultados el descubrimiento de la insulina y el metabolismo de la diabetes realizados por *Banting* y *Macleod*, utilizaron

perros, conejos y peces. Los mecanismos del electrocardiograma fueron estudiados por *Einthoven*, en perro; este método aplicado a animales que padecían patologías cardíacas fue una importante ayuda para el conocimiento, diagnóstico y tratamiento de las mismas.

Los efectos curativos de la penicilina en enfermedades infecciosas fue descubierto por *Fleming*, *Chain* y *Florey* utilizando ratones. El conocimiento de la organización funcional del cerebro y su papel coordinador de los órganos internos fue producto de estudios realizados en gato por los investigadores *Hess* y *Moniz*. Para la obtención de la vacuna contra la fiebre amarilla desarrollada por *Theiler* se utilizaron monos y ratones.

La adquisición de la tolerancia inmune fue estudiada por *Burnet* y *Medawar* en conejos. Los estudios sobre la interpretación del código genético y su papel en la síntesis de proteínas fueron realizados en ratas por *Holley*, *Khonaray* y *Nirenberg*.

El desarrollo de la tomografía computarizada se realizó por las investigaciones de *Cormack* y *Hounsfield* realizadas en cerdos. *Medawar* injertó células extrañas en embriones de ratón y comprobó, en el ratón adulto, que el animal aceptaba trasplantes de piel del mismo individuo. Este descubrimiento revolucionó la inmunología y abrió el camino hacia los trasplantes de órganos en los seres humanos

Alternativas

Aunque coloquialmente suelen identificarse los métodos alternativos con las técnicas *in vitro*, no son sinónimos. No siempre se tiene la opción del reemplazo. Actualmente, ningún modelo celular o computacional puede simular enteramente, por ejemplo, el mecanismo de funcionamiento del cerebro o las interacciones con el corazón, el hígado y los riñones.

Quizás, uno de los más importantes logros, y desde luego un punto de inflexión en la historia de las 3Rs y los ensayos con animales, fue la supresión de la prueba de estimación de la Dosis Letal 50 (DL50) de todas las normativas gubernamentales internacionales de

ensayos sobre productos químicos por la OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development)⁶.

En la actualidad, se está incentivando el desarrollo y validación de modelos moleculares y celulares alternativos al uso de animales, fundamentalmente en farmacología y toxicología. Se ha avanzado mucho en sistemas computacionales, en cultivos celulares y otras técnicas, como las de imagen no invasivas que se utilizan para la evaluación de la seguridad *in vivo* de nuevos compuestos. Estas técnicas han ayudado a reducir el número de animales hasta en un 80%⁷; por otro lado, pueden mejorar la calidad de los datos y proporcionan información sobre la estructura y función de los órganos, y el progreso de la enfermedad.

Durante las últimas décadas se ha avanzado mucho en materia de bienestar animal en la investigación. Se han establecido normativas y protocolos que garantizan una regulación de la experimentación animal y se puede resumir con la filosofía: reemplazar, reducir y refinar. Sin embargo, no se espera que se pueda evitar la experimentación en su totalidad porque algunas investigaciones, por su naturaleza, no son viables en sistemas alternativos..

Referencias

¹<http://animalresearchforlife.eu/index.php/en/medicalprogress>

²http://www.aalas.org/pdf/improve_human_animal_health.pdf

³<http://www.animalresearchcures.org/>

⁴<http://www.biocat.cat/es/nuevos-modelos-animales-para-investigacion-biomedica-y-biotecnologica>

⁵<http://seresmodelicos.csic.es/ratoli.html>

⁶http://www.remanet.net/Nueva_carpetas2/1999-2009%20AVANCES%20EN%20LA%20INVESTIGACION%20DE%20C3%93N%20DE.pdf

⁷<http://animalresearchforlife.eu/index.php/en/medicalprogress>

Presión Positiva

1901 Von Behring	Antisuero de la difteria.	 Cobaya
1903 Pavlov	Respuestas animales a varios estímulos.	 Perro
1906 Golgi, Cajal	Caracterización del sistema nervioso central.	 Caballo  Perro
1912 Carrell	Avances quirúrgicos en la sutura e injerto de vasos sanguíneos.	 Perro
1913 Richet	Mecanismos de anafilaxis.	 Conejo  Perro
1919 Bordet	Mecanismos de la inmunidad.	 Caballo  Cerdo
1923 Banting, Macleod	Descubrimiento de la insulina y mecanismo de la diabetes.	 Conejo  Perro  Pez
1924 Einthoven	Mecanismo del electrocardiógrafo.	 Perro
1932 Sherrington, Adrian	Funciones de las neuronas.	 Gato  Perro
1945 Fleming, Chain, Florey	Efecto curativo de la penicilina en las infecciones bacterianas.	 Rata
1949 Hess, Moniz	Organización funcional del cerebro como coordinador de los órganos internos.	 Gato
1959: Russell y Burch crean las "tres R" de la experimentación		
1960 Burnet, Medawar	Tolerancia inmune adquirida.	 Conejo
1966 Rous, Huggins	Tumores inducidos por virus y tratamiento hormonal del cáncer.	 Rata  Cobaya
1968 Holley, Khorana, Nirenberg	Interpretación del código genético y su papel en la síntesis de proteínas.	 Rata
1972 Edelman, Porter	Estructura química de los anticuerpos.	 Cobaya  Conejo
1979 Gormack, Hounsfield	Desarrollo de la tomografía asistida computerizada (TAC).	 Cerdo
1980 Bevacerraf, Dausset, Snell	Identificación de los antígenos de histocompatibilidad y mecanismos de acción.	 Rata  Cobaya
1992: Se funda el centro europeo para las alternativas a la experimentación animal.		
1990 Murray y Thomas	Técnicas de trasplantes de órganos.	 Perro



Granja
San
Bernardo

*Minimal Disease
Level Rabbits*

New Zealand White Rabbit.
Total absence of all important rabbit disease germens
with specific sanitary garantees.

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

Brote de mortalidad elevada en conejos californianos

David Gutiérrez Henríquez, M^a Teresa Tejedor Junco
Microbiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

En el animalario de un centro de Investigación, se encontraron varios conejos californianos (aproximadamente el 50%) muertos una semana después de ser destetados. En las jaulas de estos animales se observaron diarreas acuosas y profusas. Otros individuos del grupo presentaban signos clínicos como depresión, letargia, anorexia, fiebre,...

Se realizó la necropsia de los cadáveres y se enviaron muestras al laboratorio de Histopatología. También se mandaron muestras de corazón, hígado e intestino al Laboratorio de Microbiología para cultivo y muestras de sangre de los animales, aún vivos, para técnicas serológicas. Como diagnóstico diferencial en base a los signos clínicos se incluyeron enteropatías producidas por clostridios, salmonelosis, listeriosis, estafilococosis, adenovirus, etc.

RESULTADOS:

Laboratorio de Histopatología:

Algunos de los hallazgos anatomopatológicos fueron: mucosa icterica, hepatomegalia con áreas multifocales de necrosis (Figura 1), engrosamiento de la mucosa principalmente a nivel del íleo y ciego y focos grises en miocardio.

Laboratorio de Microbiología:

En el coprocultivo, en medios habituales, no se encontraron hallazgos significativos. En la tinción de Gram de extensiones de la diarrea de algunos animales aún vivos se observaron bacilos Gram negativos y esporas. Los resultados de los ELISA para los principales virus causantes de patología entérica

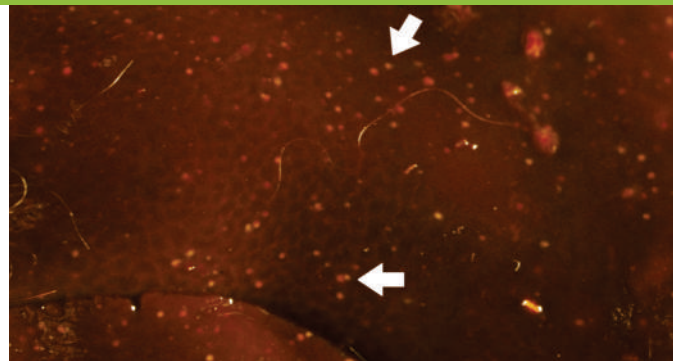


Figura 1: Hepatomegalia con múltiples focos necróticos blanquecinos (flechas blancas)

en animales de laboratorio fueron negativos. Se realizó Inmunofluorescencia (IFA) demostrándose presencia de anticuerpos frente a *Clostridium piliforme*. Pero se ha demostrado la posibilidad de falsos positivos por reacciones cruzadas.

¿Y tú qué opinas?

¿De qué agente infeccioso se trata?

¿Qué síntomas presentaría?

¿Qué otras pruebas de diagnóstico harías?

¿Qué importancia tiene?

SOLUCIÓN:

Atendiendo a los datos epidemiológicos obtenidos, al no crecimiento de otros patógenos en los medios habituales, a los resultados serológicos y a la presencia de esporas y bacilos Gram negativos en las extensiones de heces, se sospechó que el agente causal podía ser *Clostridium piliforme*. Se trata de un bacilo Gram negativo, anaerobio y formador de esporas. Es el agente causal de la enfermedad de Tyzzer, que afecta fundamentalmente a roedores y lagomorfos. También se ha descrito en otros animales (Fudge, 2000).

En conejos causa abundante diarrea acuosa, anorexia, deshidratación y pueden llegar a morir. Afecta fundamentalmente a animales en edad de destete (Percy and Barthold, 2008). El diagnóstico se puede confirmar mediante tinción de plata Warthin-Starry de extensiones de intestino e hígado, para demostrar los grupos de bacterias, con las características descritas, dentro de los hepatocitos y/o enterocitos (Figura 2).

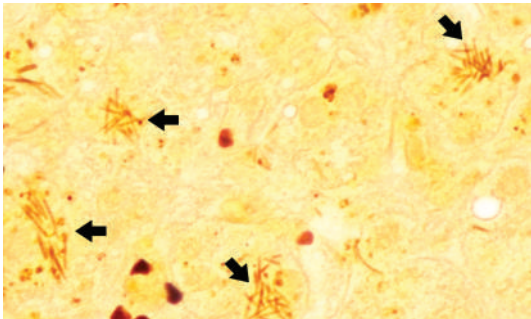


Figura 2: Grupos de bacilos intracelulares en el interior de hepatocitos. Tinción de plata Warthin-Starry (flechas negras)

La detección de anticuerpos frente a *C. piliforme* puede deberse a reacciones cruzadas y también pueden existir anticuerpos en animales asintomáticos (Schoondermark-van de Ven *et al.*, 2006).

Los clostridios son muy abundantes en la microbiota intestinal de roedores, y desempeñan un importante papel en diversas funciones fisiológicas (Momose *et al.*, 2011). Por lo tanto, la presencia de bacterias morfológicamente compatibles con *C. piliforme* no implica que se trate de esta especie. El diagnóstico puede confirmarse mediante la prueba de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para los genes del ARNr 16S (Furukawa *et al.*, 2002; Pritt *et al.*, 2010). Se ha desarrollado una PCR anidada (nested-PCR) que incrementa la especificidad y sensibilidad (Niepceron and Licois, 2010). La PCR puede ser negativa en animales inmunocompetentes pero portadores de la bacteria.

La detección de *C. piliforme* en animales de experimentación es importante dado que puede interferir en los resultados de distintos ensayos, por ejemplo modificando la farmacocinética de la warfarina y el trimetoprim, alterando los niveles de enzimas hepáticas o disminuyendo la susceptibilidad a la aparición de artritis experimental por *Yersinia enterocolitica* (Nicklas *et al.*, 1999).

Su potencial zoonótico es escaso, pero se ha descrito la infección por *C. piliforme* en un paciente con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (Smith *et al.*, 1996), por lo que en caso de inmunosupresión se deben tomar precauciones.

Por todo esto, se recomienda la monitorización del estatus en relación con *Clostridium piliforme* cada 3 meses en los roedores y lagomorfos de animalarios de experimentación (Nicklas *et al.*, 2002). La vigilancia de rutina se hace mediante ELISA, dada su rapidez y bajo coste. El cultivo no es sencillo, dado que esta bacteria sólo crece en cultivos celulares. Puesto que se trata de un microorganismo formador de esporas, y que éstas pueden sobrevivir durante largo tiempo en el ambiente, deben extremarse las precauciones higiénicas para poder asegurar su total eliminación del animalario.

Agradecimientos:

Queremos agradecer de manera especial al Dr. Ricardo E. Feinstein (*National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden*) su amable cesión de las imágenes macroscópica e histológica que ilustran este caso.

Bibliografía

- Fudge A.M. *Laboratory Medicine: Avian and Exotics pets*. Editorial WB Saunders Company. 1ª Ed (2000).
- Furukawa T., Furumoto K., Fujieda M., et al. *Detection by PCR of the Tyzzer's Disease organism (Clostridium piliforme) in feces*. Exp. Anim. 2002, 51:513-16.
- Momose Y., Park S.H., Niwa H., et al. *Design and application of group-specific oligonucleotide probes for detecting and monitoring mouse clostridia*. Lab. Anim. 2011, 45:259-67.
- Nicklas W., Hornberger F.R., Illgen- Wilcke B., et al. *Implications of infectious agents on results of animal experiments. Report of the Working Group on Hygiene of the Gesellschaft für Versuchstierkunde - Society for Laboratory Animal Science (GV-SOLAS)*. Lab. Anim. 1999, 33(1):39-87.
- Nicklas W., Baneux P., Boot R., et al. (Felasa working group on health monitoring of rodent and rabbit colonies). *Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units*. Lab. Anim. 2002, 36:20-42.
- Niepceron A. and Licois D. *Development of a high-sensitivity nested PCR assay for the detection of Clostridium piliforme in clinical samples*. Vet. J. 2010, 185: 222-24.
- Percy D.H. and Barthold S.W. *Pathology of laboratory rodents and rabbits*. Blackwell Publishing. 3ª Ed (2008).
- Pritt S., Henderson K.S., and Shek W.R. *Evaluation of available diagnostic methods for Clostridium piliforme in laboratory rabbits (Oryctolagus cuniculus)*. Lab. Anim. 2010, 44:14-9.
- Schoondermarck- Van de Ven E., Philipse- Bergmann I., and Van der Logt J.T.M. *Prevalence of naturally occurring viral infections, Mycoplasma pulmonis and Clostridium piliforme in laboratory rodents in Western Europe screened from 2000 to 2003*. Lab. Anim. 2006, 40: 137-43.
- Smith K., Skelton H.G., Hilyard E.J., et al. *Bacillus piliformis infection (Tyzzer's disease) in a patient infected with HIV-1: confirmation with 16S ribosomal RNA sequence analysis*. J. Am. Acad. Derm. 1996, 34:343-8.

Head office Castrop-Rauxel
Hermannstraße 2-8
44579 Castrop-Rauxel, Germany
phone +49 (0) 23 05 9 73 04-0
fax +49 (0) 23 05 9 73 04-44

Facility in Emmendingen
Fabrikstraße 2
79312 Emmendingen, Germany
phone +49 (0) 76 41 92 65-0
fax +49 (0) 76 41 47 97-2

Facility in Schönwalde
Hauptstraße 61b
16348 Wandlitz, Germany
phone +49 (0) 3 30 56 8 13-11
fax +49 (0) 3 30 56 8 13-12

BIOSCAPE
E E E R E F



Full service lab animal technology

Representante en España:

Mari Carmen Viso

E-Mail maria-carmen.viso@bioscape.de

Teléfono + 34 6 55 76 38 28

Fax + 34 9 66 14 96 45

info@bioscape.de

-  Cages, racks for conventional animal husbandry
-  Ventilated systems + IVC cages
-  Individual cages
-  Cage systems
-  Transport + accessories
-  Washing, cleaning + decontamination

Participa en la investigación: micro mecenazgo en f4r.org

Daniel Baizán Vicent

El micro mecenazgo es una alternativa viable para la financiación de los proyectos de investigación y f4r.org nos muestra cómo hacerlo.

En este número vamos a presentar un método alternativo que es aplicable a todos los campos de la investigación. Se trata del "crowdfunding" o micro mecenazgo, un sistema de financiación individual para lograr algo más grande, "un grano no hace granero, pero ayuda al compañero".

Para aquellos que todavía no conozcan qué es eso del micro mecenazgo se trata de un sistema en el que cada persona realiza una donación, cuyo mínimo suele ser un euro, a cambio de formar parte del proyecto como benefactor. Esta práctica ha tenido su auge, sobre todo, en la industria cinematográfica y audiovisual pero es adaptable a cualquier tipo de proyecto y, por fin, hay alguien que lo ha propuesto en el campo de la investigación, f4r.org

Como ellos mismos se definen: "Funds 4 Research (f4r.org) nace para aportar nuestro grano de arena en la búsqueda de financiación de proyectos de investigación y ciencia. Mediante la realización de pequeñas aportaciones de muchos cientos de personas podemos producir una gran diferencia. Porque mucho de nuestro bienestar futuro como Sociedad depende de la cantidad y calidad de investigación en ciencia que podamos realizar hoy."

Funds for Research es una asociación sin ánimo de lucro que tiene como objetivo colaborar en la búsqueda de financiación para llevar a cabo proyectos de investigación, y lograr una mayor concienciación de la sociedad, administraciones públicas y diferentes agentes sociales, culturales y económicos de la importancia de la inversión en Ciencia e Investigación como factor de progreso y bienestar social. El órgano directivo está compuesto por tres periodistas: Lluís Amiguet (Presidente), Teresa Ferré (Tesorera) y Manuel Murillo (Secretario). En la página se puede consultar su trayectoria profesional y sus motivaciones personales para con la asociación.

Ahora que ya se ha captado la atención podemos pasar a exponer esta alternativa de financiación de proyectos. El equipo de f4r.org lo explica muy claro para que no haya dudas: se tiene una idea; se plantea el objetivo de financiación; se calcula el periodo de vida para recabar el importe solicitado y finalmente, se tiene éxito o no. Con unos sencillos pasos creamos, proponemos y obtenemos financiación para nuestro proyecto. Así de fácil. Pero en realidad, y la realidad nos advierte, no es tan sencillo y, por eso, desde la asociación f4r dejan claras unas "Directrices de los proyectos" para que sepamos que ellos son el medio para conseguir un fin mayor que se basa en la aportación desinteresada de la gente. Si estamos interesados en solicitar un proyecto es importante leer bien las directrices para que nos queden claras cuáles son las reglas del juego.

Qué es F4R? f t s Identificarse Registrarse Idioma ▾

F4R ¿Qué es F4R? Proyectos activos Propón tu proyecto Proyectos realizados

[¿Cómo funciona?](#) [Directrices de los proyectos](#)

Comprometidos con la investigación y la ciencia

Funds 4 Research (F4R) nace por la pasión de un grupo de personas por la investigación y la ciencia como factor de progreso y bienestar social. Somos una **asociación sin ánimo de lucro** que tiene como objetivo colaborar en la búsqueda de financiación para llevar a cabo proyectos de investigación, y lograr una mayor concienciación de la Sociedad, Administraciones Públicas y diferentes agentes sociales, culturales y económicos de la importancia de la inversión en Ciencia e Investigación como factor de progreso y bienestar social.

En **F4R** estamos convencidos que nuestro futuro y bienestar como Sociedad tiene mucho que ver con el esfuerzo y dedicación que hoy realicemos en investigación y ciencia.

El **órgano directivo** está compuesto por **Lluís Amiguet** (Presidente), **Teresa Ferré** (Tesorera) y **Manuel Murillo** (Secretario).

[Qué es F4R?](#)

[¿Cómo funciona?](#)

[Directrices de los proyectos](#)

F4R supone una nueva manera de presentar proyectos de investigación para la búsqueda de la financiación necesaria para llevarlos a cabo.

Creemos en la gente, en su capacidad para organizarse, para participar, para intercambiar ideas y experiencias y para contribuir en la financiación de proyectos científicos. Pequeñas contribuciones realizadas por miles de personas pueden suponer una gran diferencia para nuestra Sociedad. Un buen proyecto científico, bien presentado y bien comunicado, puede llegar a cientos de miles de personas de una forma directa y rápida. Una comunidad amplia puede suponer una importante fuente de recursos y también de soporte para llevar a cabo interesantes proyectos.

Queremos que F4R se convierta en el lugar de intercambio de referencia para investigadores y gente interesada y comprometida con la investigación y la ciencia.

▼ La idea



Un equipo de investigación tiene una idea para un proyecto, necesita recursos para llevarlo a cabo y busca dicha financiación a través de F4R.

▼ El objetivo

A través de F4R proponen y explican un proyecto de investigación, qué quieren lograr y cómo piensan conseguirlo.

Al mismo tiempo, establecen unos objetivos económicos necesarios para llevarlo a cabo.



▼ La vida del proyecto



Durante un periodo de tiempo establecido (entre 30 y 45 días) el proyecto está vigente y cualquier persona puede realizar su aportación al mismo.

▼ Si el proyecto tiene éxito

El proyecto recibe la financiación. Las cantidades aportadas por los mecenas del proyecto son cobradas.



▼ Si no se alcanza el objetivo



El proyecto tendrá que buscar otras formas de financiación. Las cantidades comprometidas por los mecenas no son hechas efectivas.

[Qué es F4R?](#)
[¿Cómo funciona?](#)
[Directrices de los proyectos](#)

Características de los proyectos

Todo proyecto ha de tener un comienzo y un fin, ha de fijar y explicar los objetivos que persigue, cuál es el plan para lograrlo (tareas, acciones, etc.) y que resultados pretende alcanzar. Por último, no olvides hablar del equipo que va a llevar a cabo del proyecto.

No estará de más que dediques unas pocas líneas en los beneficios futuros que podrá tener la consecución de tu proyecto en relación a un colectivo determinado o al conjunto de la Sociedad. No prometas cosas irrealizables o imposibles, debes ser realista y honesto.

El investigador o grupo de investigación ha de exponer su proyecto teniendo siempre muy presente el punto de vista del público objetivo al que se dirige para solicitar su colaboración.

Si el proyecto va dirigido a un colectivo en particular, os recomendamos ponerlo en contacto con dicho colectivo antes de publicar vuestro proyecto, exponerlo e incorporar aquellas opiniones y puntos de vista que puedan enriquecerlo, tanto en contenido como en formato, y hacerlo más atractivo para la comunidad.

Si importante es presentar el proyecto de la forma más sugerente posible a la comunidad, no menos importante resulta difundir el proyecto a través de las redes sociales una vez el proyecto esté aprobado para su publicación. Puede ser un trabajo duro y requiere de la implicación de todo el equipo y para toda la duración del periodo de financiación.

No olvidéis que será la propia comunidad la que os estará evaluando continuamente, desde que publicéis el proyecto, durante todo el periodo de financiación, durante la ejecución del proyecto e incluso una vez finalizado el proyecto. Francamente, no hay nada peor que no cumplir con las expectativas de las personas, organizaciones y/o entidades de las que recibáis financiación.

En F4R tienen cabida tanto proyectos de gran envergadura como de pequeño alcance. Será la propia comunidad la que determine, a través de sus contribuciones, qué proyectos se llevarán a cabo y cuáles no.

Ni F4R ni ninguna persona de las que colabore con los proyectos adquiere ningún derecho sobre los proyectos que se publiquen en F4R, resulten los proyectos financiados o no.

¿Quién puede publicar sus proyectos en F4R?

F4R está desarrollado, en primer lugar, para cualquier investigador científico o grupo de investigadores y en segundo lugar, para cualquier persona, organización y/o entidad con un interés en participar del mundo de la ciencia.

F4R revisa los proyectos que solicitan su publicación a través de un Comité Científico y un Comité Ético. Estos Comités tienen como objetivo garantizar unos estándares mínimos de calidad y moralidad en relación al proyecto, sus objetivos, metodología, razonabilidad, resultados y sobre el equipo que lo va a llevar a cabo.

Garantías

Para F4R la creatividad, las ideas y la innovación son muy importantes y por eso nos preocupamos de proteger la propiedad intelectual e industrial y exigimos a todos los que participan en F4R que respeten dichos derechos.

La investigación y la ciencia no son ciencias exactas y muchas veces, los resultados que obtienen los proyectos difieren de los objetivos inicialmente establecidos. F4R no puede ni garantiza los resultados de los proyectos que se publiquen en F4R.

¿Qué ocurriría en caso de que el proyecto sufra retrasos, encuentre dificultades, etc.?

No es infrecuente que los proyectos se enfrenten a imprevistos e inconvenientes, al fin y al cabo cuando un investigador o grupo de investigación publica un proyecto está realizando una previsión, todo lo precisa y objetiva posible, pero una previsión.

En estas situaciones, el investigador o grupo de investigación ha de realizar el máximo esfuerzo posible para informar y justificar de los retrasos que se puedan producir en la ejecución del proyecto. La transparencia y la honestidad son unos de los valores más importantes para no defraudar la confianza de las personas, instituciones y/o organizaciones que han contribuido a financiar el proyecto.

Si el investigador o grupo de investigación están actuando de buena fe, con transparencia y honestidad, informando y justificando los motivos y causas de los retrasos del proyecto, las personas, instituciones y/o organizaciones que han contribuido a financiar el proyecto tendrían que intentar mostrar la mayor paciencia y comprensión posible, a la vez que continuar solicitando tanta información como considere necesario en relación al proyecto y al cumplimiento de los compromisos adquiridos con el investigador o grupo de investigación.

Responsabilidad

Los propios investigadores y/o grupos de investigación, al publicar su proyecto se obligan legalmente a cumplir con toda la información, compromisos y recompensas que publiquen en relación con el proyecto.

En caso de que un investigador y/o grupo de investigación no sea capaz de cumplir con los compromisos adquiridos en el proyecto, y una vez lograda la financiación solicitada, es responsable de reintegrar íntegramente los fondos recibidos a todos y cada uno de las personas, instituciones y/o organizaciones que hayan contribuido a su financiación.

F4R facilita el encuentro entre personas, organizaciones y/o entidades que necesitan recursos para llevar a cabo proyectos de investigación y personas, organizaciones y/o entidades que quieren realizar aportaciones para financiar dichos proyectos. Las transacciones, dinerarias y no dinerarias, se realizan entre estas dos partes y es por ello que F4R no puede realizar ningún reembolso de ningún tipo a ninguna de las partes que participan en un proyecto.

Con toda la información bien leída nos disponemos a proponer nuestro proyecto. Para ello sólo hay que dirigirse a la pestaña de "Propón tu proyecto" que nos llevará a la página de registro de usuario. En ella también encontraremos acceso para la visualización de la asociación en las redes sociales, tan importantes en este tipo de iniciativas. Una vez creado el registro se deben seguir los pasos indicados.



Libros y páginas web

La mejor forma de ver cómo funciona es poner un ejemplo, el proyecto que está actualmente en activo. En este caso el proyecto que busca financiación es "El Estudio del Síndrome de Lowe". La responsable del proyecto es la Doctora Mercedes Serrano que actualmente trabaja como investigadora para el CIBER-ER. Realizando un barrido rápido de la página del proyecto activo podemos encontrar un índice en el que nos muestra unas pestañas con toda la información que podamos necesitar.

Índice
Antecedentes
Descripción
Objetivos
Equipo investigador
Resultados esperados
Calendario
Recompensas
Duración del período de financiación
Importe a solicitar
Prensa

Cada uno de los apartados nos ofrece información concreta que debemos conocer acerca del proyecto, de la gente que pretende trabajar en él, para qué se va a utilizar el dinero recaudado o a quién va a beneficiar. Además, encontrarás unas pestañas que te van a llevar a las novedades, comentarios, mecenas y a las preguntas que puedas tener sobre el proyecto. Las novedades te van a servir para poder poner cara a las personas para las que va destinado el proyecto y a la gente que se convierte en embajadora de esta iniciativa.

También es interesante que nos fijemos en los mecenas y en los "beneficios" que obtienen con sus donaciones. Hay que recordar que estos "micro

mecenazgos" son para una buena causa y no se debe esperar nada a cambio: Pero en función de tu aportación, el proyecto "te premia" por ello. Aunque el verdadero premio es simplemente aportar un poco para que se pueda ayudar a muchos.

Ayúdanos a conseguirlo
(cantidad mínima fijada en 1 €)

RESPONSABLE DEL PROYECTO


Dra. Mercedes Serrano

Colabora con 10 € o más
110 Mecenas
Benefactor x10
Tu nombre figurará en nuestra web como "benefactor".

Colabora con 20 € o más
94 Mecenas
Benefactor x20
Tu nombre figurará en nuestra web como "benefactor".

Colabora con 40 € o más
60 Mecenas
Benefactor x40
Tu nombre figurará en nuestra web como "benefactor".

Colabora con 60 € o más
30 Mecenas
Benefactor x60
Tu nombre figurará en nuestra web como "benefactor".

ESTADO DEL PROYECTO


44.888 € RECAUDADO
44.067 € MÍNIMO
97.224 € META ÓPTIMA
463 MECENAS
0 SEGUNDOS RESTANTES
101.9% ÉXITO (MÍN.)

Compártelo

Ayúdanos a conseguirlo
(cantidad mínima fijada en 1 €)

Ahora ya conocemos otra "alternativa" a la financiación de la investigación. Tanto si quieres colaborar con el proyecto que esté activo como si quieres crear el tuyo propio, no dejes de visitar la página <https://f4r.org/web/projects/view/2>

Las nanopartículas y el sistema inmunitario

Reproducimos hoy una noticia con origen en CORDIS, de fecha 12 de Febrero de 2013. En ella se presenta una reflexión sobre las nanopartículas, se nos comenta la estrategia de estudio con interesantes sistemas 'in vitro' y las posibles repercusiones en la reducción del uso de animales en diversos ensayos.

Espero que os guste.

Jesús Martínez Palacio

La nanotecnología resulta tan innovadora que nadie sabe a ciencia cierta cuáles serán sus aplicaciones. Las predicciones van desde la capacidad de reproducir objetos como diamantes y alimentos, hasta una catástrofe provocada por nanorobots autorreplicantes que consumirán el planeta.

Hasta hace poco la naturaleza era la única capaz de «fabricar» materia molecular. No obstante, desde hace unos años se cuenta con la nanotecnología, una disciplina que reúne distintos ámbitos de la ciencia y que podría generar innovaciones que contribuyan a solucionar muchos de los problemas a los que se enfrenta la sociedad moderna.

Los productos nanotecnológicos ya están presentes en el mercado en forma de componentes electrónicos, pinturas a pruebas de arañazos, material deportivo, telas antiarrugas y antimanchas y cremas solares. Los analistas calculan que el valor de mercado de este tipo de producto ya asciende a cientos de miles de millones de euros y podría alcanzar el billón de euros en 2015.

Esto implica también que el potencial de exposición, tanto en entornos laborales como sociales, a las nanopartículas artificiales podría aumentar enormemente a corto plazo. La toxicidad asociada a distintas nanopartículas se ha estudiado tanto *in vitro* como *in vivo*, pero la información sobre los riesgos para la salud y el medio ambiente de las nanopartículas artificiales sigue siendo escasa. Los efectos que ejercen las propiedades de las nanopartículas en el sistema inmunitario siguen sometidos a estudio en investigaciones que, por lo general, se pueden clasificar en dos grupos, según su tema de trabajo: (a) respuestas a las nanopartículas modificadas a propósito para estimular el sistema inmunitario y (b) efectos secundarios no deseados de las nanopartículas.

El proyecto InLiveTox, financiado desde hace tres años por la Unión Europea, ha logrado progresos considerables en cuanto a la capacidad para estudiar nanopartículas *in vitro*. Esta iniciativa se dedicó al estudio de la influencia de las nanopartículas en el intestino, el sistema cardiovascular y el hígado. La exposición por ingestión resulta de especial interés debido a la inclusión de nanopartículas en los alimentos y su envasado y en las medicinas administradas por vía oral.

El equipo del proyecto desarrolló un sistema innovador de ensayo *in vitro* modular y basado en

fluídica y demostró su utilidad para simular la respuesta de determinados tejidos a nanopartículas consumidas por vía oral. Los resultados de este sistema se validaron en un estudio *in vivo* con ratas sobre toxicidad y biocinética de las nanopartículas tras su ingestión. Se utilizaron tejidos de estos animales para investigar respuestas toxicológicas de los órganos y sistemas mencionados. Los datos obtenidos se compararon con otros estudios biocinéticos sobre partículas similares pero dedicados a otras vías de exposición como la respiratoria. En el estudio se compararon datos procedentes de un estudio *in vivo* de la exposición por inyección e ingestión con los obtenidos mediante ensayos estándar (estáticos de una célula). El sistema mostró un patrón significativo de diferencias y similitudes, en concreto en lo referente a la inflamación, y diferencias claras en la importancia fisiológica de distintos métodos.

Esto implica que los resultados del proyecto InLiveTox podrían modificar los ensayos que se realizan en los sectores farmacéutico, químico, cosmético y alimentario para comprobar la seguridad y la eficiencia de materiales nuevos. La mejora de estos métodos podría reportar importantes beneficios económicos, tanto mediante la reducción de los costes de ensayo por un menor uso de animales, como por la oportunidad de comercializar productos más seguros con mayor rapidez que con los métodos existentes, todo ello sin dejar de cumplir con la normativa REACH. La tecnología desarrollada en el marco de este proyecto podría otorgar una ventaja competitiva a los primeros en adoptarla. Su utilidad como herramienta de ensayo e investigación de entidades químicas nuevas se extiende a la toxicología y la farmacología. Los resultados del proyecto superaron todas las expectativas y permitieron generar una tecnología innovadora e interesante con capacidad para respaldar la creación de nuevos productos mediante técnicas *in vitro*. A mayor escala, el proyecto confirma la ventaja competitiva que poseen las organizaciones científicas de Europa, a nivel internacional, en el campo en rápido desarrollo de los ensayos *in vitro*.

El consorcio está formado por un equipo interdisciplinario de expertos europeos en nanotoxicología, farmacia e ingeniería y un grupo científico estadounidense de la Universidad de Rochester y contó con financiación del Séptimo Programa Marco (7PM) a través de la convocatoria FP7-NMP-2008-1.3-2.

Para más información, consulte:
<http://www.inlivetox.eu/>

Cuando la trazabilidad es una necesidad SOURALIT es su garantía

SOURALIT

Madera no resinosa

Mínima presencia de polvo

Gran capacidad de absorción

Presentaciones irradiadas envasadas al vacío

Análisis microbiológicos y fisico-químicos de los lotes entregados



Guillermo Repetto Kuhn

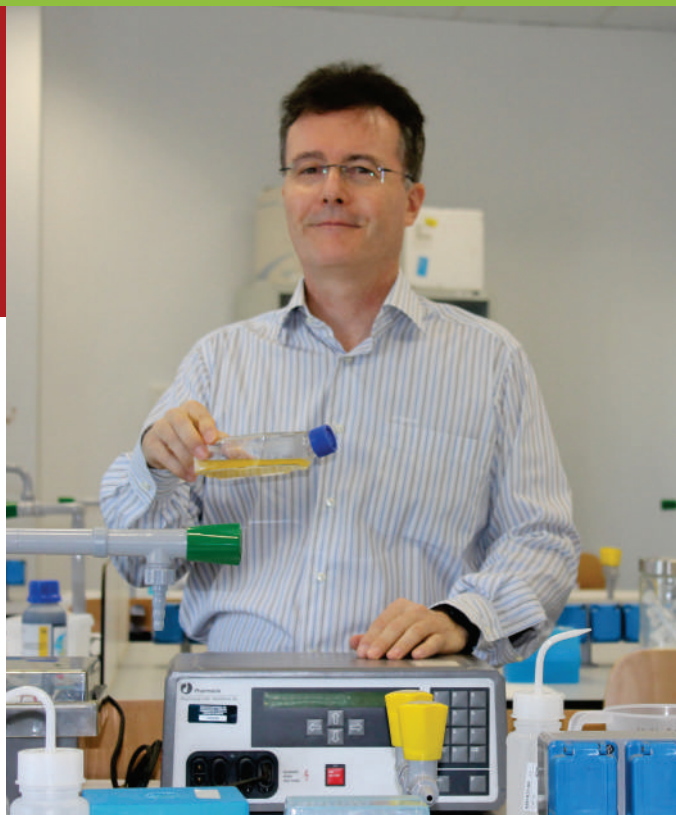
Doctor en Medicina y Cirugía y Máster en Toxicología. Responsable del Área de Toxicología de la Universidad Pablo de Olavide, reconocido promotor del empleo de métodos alternativos a la experimentación animal, especialmente de procedimientos in vitro.

¿Cómo nace REMA y qué objetivos reivindica?

Muy pocos recuerdan que tras tres reuniones exitosas sobre alternativas en Madrid en 1997, llegamos a la conclusión de que era imprescindible crear una nueva estructura específica sobre alternativas, para poder llegar a muchos investigadores y entidades a los que no teníamos acceso ni desde SECAL ni desde la Asociación Española de Toxicología. No es ningún secreto la participación en esta decisión de Alberto Giráldez, entre muchos otros. Tras dos años intensos de trabajo de la Comisión Promotora, creamos en 1999 la Red Española para el Desarrollo de Métodos Alternativos a la experimentación animal como un foro de encuentro y diálogo entre el mundo científico, la industria, la administración y los grupos sociales interesados en los métodos alternativos a la experimentación animal, incluidos los de defensa animal, con el fin de conseguir una mejor y más eficaz aplicación de los principios de reducción, refinamiento y reemplazo del uso de animales en la experimentación.

En los 14 años de andadura de REMA, ¿ha habido por parte del conjunto de investigadores que emplean modelos *in vivo* una mayor voluntad por reemplazar el uso de animales por modelos alternativos?

Como socio de SECAL he tenido la suerte de conocer a muchos investigadores en congresos y en cursos de formación y también de recibir sus consultas. He podido observar un aumento generalizado muy importante no sólo en su competencia práctica para experimentar con animales aplicando sistemáticamente los conceptos de reducción y refinamiento, sino también en su apreciación de que no es lógico experimentar con animales cuando existan otras opciones.



En cuanto a las autoridades reguladoras, ¿existe la idea de poder realizar estudios, principalmente de seguridad y toxicología, únicamente con ensayos *in vitro*?

En los últimos años se han ido validando, aceptando e implementando en las evaluaciones de seguridad una interesante serie de procedimientos *in vitro* (corrosividad dérmica, irritabilidad ocular, fototoxicidad, absorción dérmica...), que están ya reduciendo sensiblemente el empleo de animales con esta finalidad. El problema radica en que existen muy diversas autoridades regulatorias y que las decisiones finales las toman los políticos. De hecho, estos avances podrían distorsionarse ante decisiones políticas, como la prohibición de ensayar ingredientes cosméticos en animales a pesar de que aún no se disponen de alternativas, lo que puede perjudicar mucho a la competitividad de la industria europea.

En su opinión, ¿se ha concienciado y sensibilizado el conjunto del personal investigador ante el tema de la experimentación animal frente a otras posibilidades?

Creo que una gran parte de los investigadores están concienciados de que, con objeto de que se autoricen los proyectos, la legislación obliga a demostrar que no existe otra opción al empleo de animales para conseguir una determinada información. Ahora, además, deben justificar el interés de llevar a cabo el estudio. Esta sensibilización no implica que no les resulte "molesto" tener que dedicar parte de su tiempo a cumplimentar los documentos necesarios para solicitar la autorización de sus proyectos, lo que es absolutamente justificable.

¿Cree que se debería empezar a concienciar desde los periodos de formación de futuros investigadores, sobre métodos alternativos e implementarlos en los programas?

Debiera formarse lo antes posible al investigador para que la primera pregunta que se plantee sea ¿cuál es el modelo más simple con el que puedo obtener la información que necesito para demostrar mi hipótesis de trabajo?. A partir de la respuesta podrá ir diseñando y construyendo su investigación usando sólo los animales imprescindibles.

¿Llegará el día en que se puedan realizar ensayos fidedignos, teniendo la seguridad de que estamos dando por válidos resultados no probados en seres vivos?

Probablemente en unos años una gran variedad de estudios en animales puedan sustituirse por baterías de ensayos *in vitro* y los que se realicen en animales sean estudios sofisticados que se apliquen en muy pocos individuos con el fin de confirmar o excluir otras investigaciones previas. Sin embargo, existen algunos ámbitos, como los estudios conductuales, en los que probablemente precisemos más datos que los que puedan suministrarnos otros sistemas, por ejemplo, los invertebrados.

¿Podría contarnos por qué eligió la toxicología como especialidad?

En 1983 accedí al Instituto Nacional de Toxicología de Sevilla en una época muy productiva en la que se estaban realizando estudios experimentales relacionados con el síndrome del aceite tóxico junto a evaluaciones de seguridad de medicamentos, cosméticos y aditivos alimentarios. Con ello aprendí a trabajar con muchas especies animales, incluidos perros, gallinas, peces o cangrejos, además de con embriones de pollo y cultivos celulares. Una estancia predoctoral en Inglaterra confirmó mi enganche con la Toxicología, que trato de transmitir a mis alumnos de la Universidad Pablo de Olavide.

► Fuente: Concurso de Fotografía SECAL





Powering your research development



Profesionales al servicio de la investigación

Servicios integrales para Animalarios

Externalización de servicios de Animalarios

Formación de personal

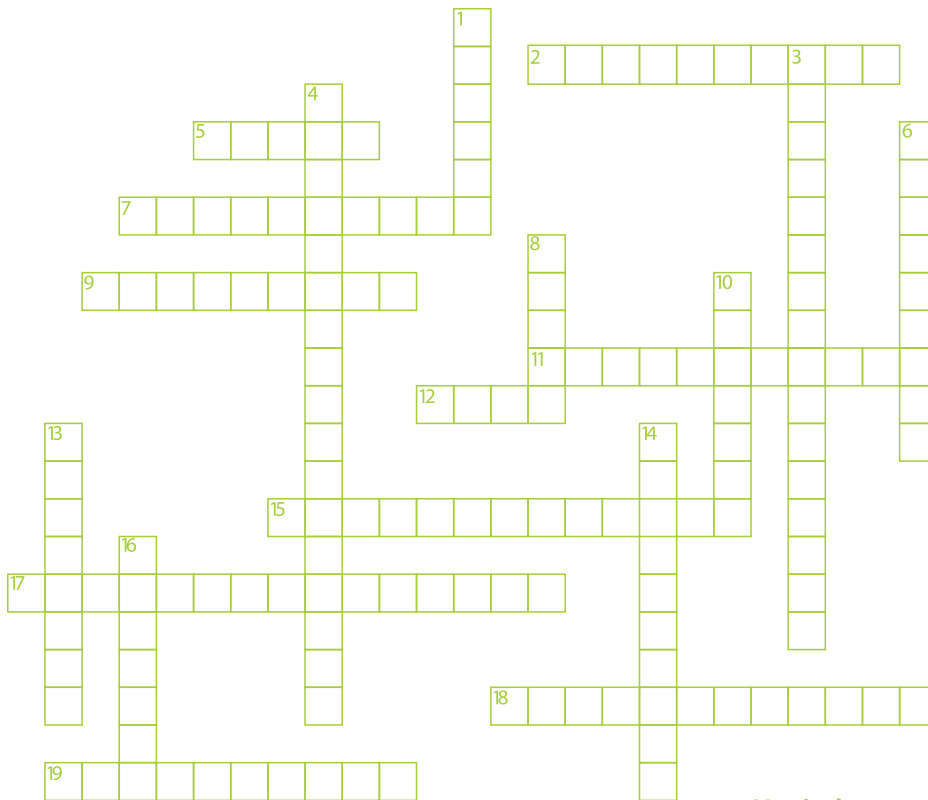
Diseño de Instalaciones

Alquiler y gestión de Instalaciones

Consultoría y Asesoramiento



www.vivotecnia-ms.com



Horizontal

- 2) Tipo de administración que se efectúa por una vía distinta de la digestiva.
- 5) European Centre for the Validation of Alternative Methods.
- 7) Técnica utilizada para extracciones repetidas de sangre.
- 9) Grado de coincidencia entre los resultados obtenidos con el método de ensayo y los valores de referencia aceptados.
- 11) Estudios con modelos animales anteriores a humanos.
- 12) Red Española para el Desarrollo de Métodos Alternativos a la Experimentación Animal.
- 15) Sustancia problema identificada incorrectamente como positiva.
- 17) Mecanismo por el que la respuesta inmune provocada por un antígeno aparece con mayor intensidad tras una administración inicial.
- 18) Observación que es muy diferente de los otros valores en una muestra aleatoria de una población.
- 19) Medida del grado en que un método de ensayo puede aplicarse de forma reproducible a lo largo del tiempo, utilizando el mismo protocolo.

Vertical

- 1) Sustancia seleccionada para utilizarse en el proceso de validación, cuya respuesta en el sistema de ensayo de referencia *in vitro* o *in vivo* o en la especie de interés ya se conoce.
- 3) Capacidad de una prueba o experimento de ser reproducido o replicado.
- 4) Proceso de gestión por el que personas independientes de las que afectan el ensayo evalúan el cumplimiento de normas.
- 6) La interrupción de la vida de un animal con menor sufrimiento posible, de acuerdo con su especie y estado.
- 8) European Consensus Platform for Alternatives.
- 10) Selección o elección de lo que interesa.
- 13) Programa de trabajo con un objetivo científico definido y en el que se realizan una o varios procedimientos.
- 14) Área dedicada a la producción y mantenimiento de animales de experimentación, dando apoyo tanto a la investigación como en las técnicas necesarias para su realización.
- 16) Conjunto de procedimientos destinados a preservar de gérmenes o microbios una instalación o un organismo.

Respuestas en www.secal.es



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



Referencias disponibles bajo demanda.

Rendimiento probado
de líneas celulares.

Tal como demuestran publicaciones de las más reconocidas instituciones investigadoras de todo el mundo, los modelos oncológicos de Harlan Laboratories ofrecen especificaciones de alta calidad, dietas y servicios de asistencia que pueden necesitar en su investigación contra el cáncer.

Para más información, visite nuestra Web www.harlan.com/oncology.

Modelos

Dietas

Servicios



www.harlan.com

©2010 Harlan Laboratories, Inc.
Harlan, Harlan Laboratories, Helping you do research better, and the Harlan logo are trademarks of Harlan Laboratories, Inc.