

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

ANIMALES DE LABORATORIO

Primavera 2015. Número 65

CRIOPRESERVACIÓN



El método CARD se consolida como el mejor protocolo de tecnología de la reproducción de ratón

Criopreservación de ovario

Seguridad en el manejo de nitrógeno líquido (LN2)

Entrevista: Lluís Montoliu José
Investigador Científico del CSIC
Centro Nacional de Biotecnología,
Madrid

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



Grupo Editor



REVISTA DE LA SOCIEDAD

ESPAÑOLA PARA LAS
CIENCIAS DEL ANIMAL
DE LABORATORIO
www.secal.es

DIRECTORA

Teresa Rodrigo Calduch
direccion.revista@secal.es

SUBDIRECTOR

Hernán Serna Duque
direccion.revista@secal.es

EDITORES DE ESTILO E IMAGEN

Olga Fernández Rodríguez
Juan de Dios Hourcade Bueno
Lara Sedó Cabezón

PUBLICIDAD

Amaia Enbeita
publicidad.revista@secal.es

FOTO DE PORTADA

Larva Warhol, autor: José María Lacave

DISEÑO Y MAQUETACIÓN

CONEXION E.P.
clientes@agenciaconexion.com.co

IMPRIME

LCS REPROGRAF

DEPÓSITO LEGAL
M-1362-1999

Responsables Secciones



**NOTICIAS SECAL
ACTUALIDAD**
Cristina Gerbolés Freixas
kgerboles@gmail.com



TÉCNICAS
María Granada Picazo
mgpicazo@sescam.jccm.es



**ÉTICA Y LEGISLACIÓN
SEGURIDAD EN 5 MINUTOS**
Jesús Martínez Palacio
jesus.martinez@ciemat.es



¿Y TÚ QUÉ OPINAS?
José Luis Martín Barrasa
jlbarrasa@gmail.com



LIBROS Y PÁGINAS WEB
Daniel Baizán Vicent
baizan@vivotecnia-ms.com



FACTOR HUMANO
Javier Fidalgo Fernández
fidalgo@ocelata.com



AL CUIDADO
Paloma García Potrero
pgarcia@srv.cnio.es



PANORAMA
Luis Muñoz de la Pascua
imp@usal.es



CONTROL SANITARIO
Sara Capdevila i Larripa
scapdevila@prbb.org

Junta de Gobierno

PRESIDENCIA

Javier Guillén Izco (2011-2015)

VICEPRESIDENCIA

Antonio Martínez Escandell (2013-2017)

SECRETARÍA

Elena Ciordia Balduz (2011-2015)

VICESECRETARÍA

Angel Naranjo Pino (2013-2017)

TESORERÍA

Isabel Blanco Gutiérrez (2011-2015)

VICETESORERÍA

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)

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.
GLAXO SMITHKLINE
GRANJA S. BERNARDO
HARLAN LABORATORIES MODELS
MEVION TECHNOLOGY S.L.
IZASA S.A.
NIRCO S.L.
NORAY BIOINFORMATICS S.L.U.
PANLAB S.L.U.
RETTENMAIER IBERICA S.L.
SODISPAN RESEARCH SL
SOURALIT
SDS DIETEX FRANCE
STERILTECH S.L.
STERIS
VESTILAB S.A.
VIVOTECNIA

Organizamos los cursos
(semipresencial y online)
que necesite su institución.

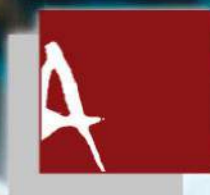
Matrícula reducida para
alumnos de su institución
y socios de SECAL.

*Una formación de calidad
para una investigación de
calidad*

*Su bienestar es nuestro
bienestar*

 sociedad española
para las ciencias
del animal de laboratorio

Con la colaboración de SECAL



Animalaria

Formación y Gestión S.L.

www.animalaria.org Tel. 699921930

EDITORIAL

8 NOTICIAS

- Actividades de la SECAL.
- Alegación del ICOV a la función de "veterinario designado" de la nueva normativa.

10 ACTUALIDAD

- The European Animal Research Association (EARA): Divulgación científica en torno a la experimentación animal.
- Nueva molécula para tratar el Alzheimer.
- Terapia génica contra el infarto de miocardio.
- Roedores inmunes al cáncer.
- El hígado graso responde peor ante una infección bacteriana que uno sano.

17 ARTÍCULOS

- El método CARD se consolida como el mejor protocolo de tecnología de la reproducción de ratón.
- Criopreservación de ovario.
- Bancos de embriones de ratón.
- Descongelando a *Danio*.

36 TÉCNICAS

- Ovariectomía en ratonas de laboratorio.
- Refinando la extracción de espermatozoides en ratón: el muestreo epididimario *in vivo*.

46 ÉTICA Y LEGISLACIÓN

- Animales de Experimentación: nueva regulación de los requisitos de capacitación del personal encargado de su manejo.

49 PANORAMA

- Diseño de Animalarios. Principios básicos.

53 FACTOR HUMANO

- Incertidumbre e innovación.

56 AL CUIDADO

- Puntos críticos en el cambio de cubetas.

60 SEGURIDAD EN 5 MINUTOS

- Seguridad en el manejo de nitrógeno líquido (LN2).

65 CONTROL SANITARIO

- La criopreservación marca el camino para el control de la salud genética y microbiológica de nuestros modelos murinos.

69 LIBROS Y PÁGINAS WEB

- La congelación de un instante.

72 ENTREVISTA

- Lluís Montoliu José.

78 CRUSECAL 65

37





Foto: shutterstock

Un modelo al lado de los humanos

ESTA CABRA NOS PODRÁ AYUDAR FRENTE AL DETERIORO DEL ALZHEIMER

El aprendizaje y la memoria dependen en gran medida de la funcionalidad de las espinas dendríticas y del ácido docosahexaenoico, un ácido graso esencial poliinsaturado de la serie omega-3. Se han encontrado evidencias que sugieren que el consumo de este ácido graso puede ayudar a evitar el deterioro que causan algunas enfermedades neurodegenerativas humanas.

Científicos españoles han demostrado experimentalmente que actuando sobre la alimentación de los cabritos desde la lactancia, se obtiene una carne con un perfil de ácidos grasos diferente al normal, y mucho más neuroprotector.



www.secal.es

Vida suspendida

Sin duda alguna pasan ya algunos quinquenios desde la primera vez que se propuso la criopreservación como un proceso en el que células o tejidos se congelan a temperaturas muy bajas. Hoy en día, existen un gran número de embriones y esperma de ratones modificados genéticamente que se encuentran criopreservados en bancos de recursos genéticos establecidos en diferentes países de todo el mundo.

Como la quimera misma de la humanidad para mantener el control del estado biológico de un órgano por medio de la criopreservación, así mismo este número logrará congelarnos no sólo en el tiempo y la historia de la criopreservación, sino en una serie de artículos que nos ayudarán, sin duda, a entender y aprender algunos de los métodos y procesos importantes dentro del ámbito de la experimentación animal y la criopreservación.

Agradecer al Dr. Jorge M. Szein la coordinación de los artículos y más específicamente, haber conseguido que dos investigadores tan reconocidos como Toru Takeo y Naomi Nakagata, hayan escrito un artículo que él mismo ha traducido al español.

Esperamos que este número os aporte las propiedades solubles suficientes para fortalecer el medio que necesitan de camino a descongelar vuestros conceptos y criopreservar vuestras experiencias en este campo.

Dirección Revista SECAL



Foto: shutterstock

Actividades de la SECAL

El 29 de enero y el 27 de abril de 2015 se celebraron reuniones ordinarias de la Junta de Gobierno de la SECAL. A continuación, se presenta un resumen de los principales temas tratados en ambas reuniones.

Relaciones internacionales

Laboratory Animals Ltd. (LAL)

En la reunión de diciembre de 2014, se aprobó el sistema de suscripciones y pago por franjas.

Se han resuelto las solicitudes de ayuda económica para la realización de actividades y el Congreso de Cáceres recibirá una ayuda de 2.500 € por parte de LAL.

Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA)

Rus-LASA ha sido admitida como miembro de FELASA.

El "Accreditation board of training and education" está trabajando para que los cursos acreditados se adapten a los requerimientos legales. Se han seleccionado dos nuevos participantes procedentes de Scand-Las y GV-Solas.

Se ha disuelto el "Accreditation Board for Health Monitoring Prog. And Labs".

Se ha aprobado la propuesta de unión de FELASA al proyecto con EFPIA y el Eurogrupo de bienestar animal.

Respecto a las novedades relacionadas con los grupos de trabajo:

- Cuidado de Cefalópodos. El documento final se va a publicar como suplemento de *Laboratory Animals*. FELASA ha decidido financiar esta publicación con 2.000 €.
- Se proponen tres nuevos grupos de trabajo: monitorización sanitaria en peces, animales de granja y animales salvajes.

Relaciones nacionales

Confederación de Sociedades Científicas de España (COSCE)

COSCE ha elaborado un documento para comunicar la necesidad de la investigación animal.

Por otra parte, en la última reunión se cambió parte de la junta directiva. El vocal de las ciencias de la vida sigue siendo Juan Lerma.

Relaciones con el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) y el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO)

Ya se ha firmado por parte de SECAL el convenio de colaboración con el MAGRAMA y se está a la espera de recibirlo firmado por su parte.

Y también...

- A 27 de abril de 2015, SECAL tiene 366 socios numerarios y 28 socios benefactores.
- El Congreso SECAL-SPCAL 2015 ha conseguido una aportación económica de la Universidad de Cáceres de 600 € y que el Libro de Resúmenes sea editado por LAL.
- Ya se han enviado a LAL los artículos de los Grupos de Trabajo de Biobancos y de Controles Microbiológicos.
- El 24 de marzo de 2015 empezó la segunda edición de AALAS-*e-learning Library* con la participación de 36 socios de SECAL.
- Sergi Vila sustituye a Juan de Dios Hourcade como administrador de la web de SECAL.
- Se van a digitalizar desde el inicio todos los números de la Revista "Animales de Laboratorio" para colgarlos en la web.



www.secal.es

sociedad española
para las ciencias
del animal de laboratorio

Alegación del ICOV a la función de "veterinario designado" de la nueva normativa

El Colegio de Veterinarios de la Provincia de Cádiz, a través del Consejo Andaluz y el Consejo General, presentó una alegación al Borrador que pretendía regular la materia en España. El texto original no dejaba clara la formación académica necesaria para ejercer las funciones de 'veterinario designado', por lo que facilitaba el intrusismo profesional y, a la larga, podía suponer un riesgo para la Salud Pública, en opinión del colectivo de veterinarios gaditanos.

El Colegio de Veterinarios de la Provincia de Cádiz ha expresado su satisfacción por el reconocimiento de la titulación de Veterinaria como requisito indispensable para obtener la capacitación como 'veterinario designado', recogida en la Orden

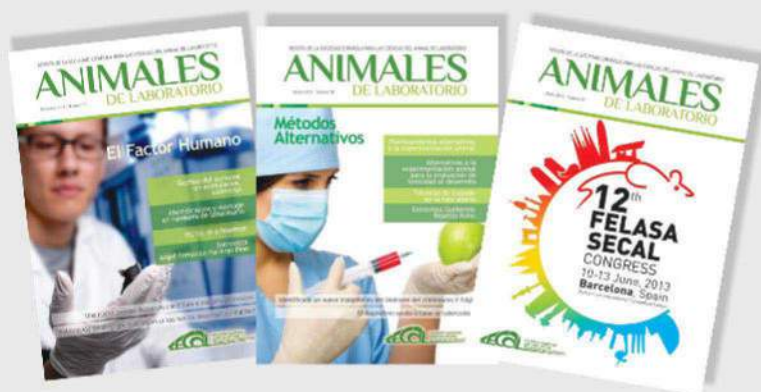
ECC/566/2015, de 20 de marzo, por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, publicada en el BOE del 1 de abril.

“Un cambio sustancial y significativo –afirma José Manuel Sánchez Almeneiro, vocal de la Junta de Gobierno del ICOV Cádiz– porque la única titulación que permite el ejercicio de la veterinaria en España es la de Veterinaria”.

De ahí la satisfacción generada en el seno de los profesionales veterinarios en la provincia de Cádiz.

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

**ANÚNCIATE
EN ANIMALES
DE LABORATORIO
LA REVISTA DE
LA SECAL**



publicidad.revista@secal.es

SECAL sociedad española
para las ciencias
del animal de laboratorio

The European Animal Research Association (EARA): Divulgación científica en torno a la experimentación animal

Emma Martínez Sanchez

PR and Communication Officer, European Animal Research Association (EARA)

El pasado 3 de marzo se presentó en la Comisión Europea la petición de los ciudadanos europeos 'Stop Vivisection'. La petición, que ha sido respaldada por 1.2 millones de firmas, pide que se abrogue la Directiva 2010/63/EU que protege los animales utilizados para fines científicos y pretende prohibir de esta manera toda experimentación con animales. Los organizadores argumentan que la experimentación con animales constituye un riesgo para la salud humana y acusan a la directiva de prevenir el desarrollo de métodos alternativos. La petición fue discutida en el Parlamento Europeo el pasado 11 de mayo y la comisión tiene que dar a conocer sus razones para considerar o rechazar esta petición antes del 3 de junio.

El pasado mes de enero en Italia, tras una extensiva campaña animalista con pinceladas políticas, un juez declaró culpables de maltrato y muerte de decenas de perros a los veterinarios responsables de una compañía que cría estos animales para fines científicos. La misma organización que está detrás del boicot a estos criadores de perros, y que se opone al uso de animales en experimentación, también ha centrado sus esfuerzos durante largo tiempo en un científico de la Universidad *La Sapienza* de Roma, acusándole de realizar crueles experimentos en monos y de ejercer una política de secretismo. La persistente campaña fue finalmente recogida en diciembre del año pasado por el programa sensacionalista *Strizia la Notizia*, incluyendo una entrevista al presidente de esta organización animalista. Lo que este reportaje no menciona son los beneficios obtenidos gracias al uso de Rhesus macacos en estas investigaciones, cuyos experimentos están diseñados para entender el procesamiento visual en el cerebro y que han aportado información significativa sobre el desarrollo de interfaces cerebro - ordenador para el control de extremidades prostéticas.

Otro ataque a investigadores italianos se produjo en diciembre del 2013 en otra universidad italiana, esta vez en Milán. Allí se distribuyeron posters y panfletos en los que se proporcionaban fotos e información de contacto de varios investigadores, acusándoles de asesinos. Esta misma universidad



**European Animal
Research Association**

ya había sido atacada unos meses antes, cuando varios activistas entraron en el animalario y liberaron a cientos de animales sujetos a proyectos de investigación y cambiaron las etiquetas que identificaban a los animales en sus cajas, tirando por la borda años de investigación.

En Alemania, el último ataque ocurrió en el Instituto de Biología Cibernética de Tubingen, que forma parte de la Sociedad Max Planck. En septiembre del año pasado se emitió un vídeo en la televisión alemana en el que se mostraban unas duras imágenes de monos con los que se investiga sobre complejos procesos cerebrales. Este vídeo fue el resultado de una 'investigación' encubierta llevada a cabo por la famosa organización inglesa *British Unión Anti Vivisection*, en colaboración con el grupo animalista alemán *Soko Tierschut*. El vídeo tiene una duración de siete minutos en los que se recogen las peores escenas que se pueden encontrar durante los siete meses de grabaciones que el técnico de laboratorio llevó a cabo mientras estuvo infiltrado. La edición del vídeo incluía una narrativa apelando a la compasión y empatía de la audiencia sin hacer ninguna referencia al tipo de estudios o al beneficio obtenido a través de los mismos. A consecuencia de esta campaña de difamación y de la falta de apoyo institucional, el investigador principal de este proyecto, y director de ese centro de investigación, ha indicado su decisión de acabar con estos experimentos en macacos.

Estos grupos que se oponen al uso de animales en investigación disfrutan cada vez más de una amplia representación a nivel Europeo. En la actualidad están mejor organizados, coordinados, subvencionados y están alcanzando

progresivamente un mayor respaldo por parte de ciudadanos y parlamentarios. Sus sutiles campañas de información están forzando el mensaje de que la investigación con animales es innecesaria, mala ciencia y que conlleva efectos dañinos para la salud de la población. Estos grupos desafían toda organización cuyas actividades impliquen el uso de animales para fines científicos, incluyendo universidades, centros de investigación, industria biotecnológica y farmacéutica, criadores de animales de laboratorio y compañías de la cadena de abastecimiento.

Estos ataques a la investigación no sólo causan un gran daño económico, emocional y destrozan años de reputación, sino que además suponen una importante amenaza para el futuro de la investigación biomédica, ya que debilitan el respaldo que ésta recibe por parte de los distintos sectores de la sociedad. A pesar de estas preocupantes consecuencias, existen muy pocas organizaciones en Europa que defiendan la investigación biomédica y el papel fundamental que los modelos animales juegan en su desarrollo. En estos momentos turbulentos, cuando cada vez hay más iniciativas que incitan a rechazar el uso de animales en investigación sin tener en cuenta sus consecuencias, es cuando se hace ineludible la creación de una red pan-Europea que defienda con voz unánime el papel de los modelos animales en biomedicina. Esto es precisamente lo que se persigue desde EARA, la Asociación Europea para la Investigación con Animales (por sus siglas en inglés, *the European Animal Research Association*).

EARA se fundó a principios del 2014 para ayudar a crear un clima favorable en Europa en relación a las investigaciones científicas que requieren el uso de animales. Nuestra misión se centra en tres pilares. El primero es proporcionar apoyo, asesoramiento y formación a centros de investigación para que éstos y sus investigadores puedan emitir un mensaje claro y específico, que incluya mayor transparencia, en sus comunicaciones acerca del uso de animales en experimentación. El segundo pilar de nuestras actividades consiste en contribuir al mantenimiento y mejora de la cadena de abastecimiento, fomentando y apoyando a las organizaciones que se dedican a la cría, mantenimiento y transporte de animales destinados a estos fines. Finalmente, EARA ayuda a formar y establecer grupos que defiendan el papel de los animales en experimentación científica para ganar así mayor apoyo ciudadano.

Para alcanzar nuestro objetivo y mejorar la opinión pública en Europa en torno a este delicado tema, y que forme una parte

reconocida del trabajo de investigadores, EARA proporciona información inteligible a ciudadanos, medios de comunicación y parlamentarios, a nivel nacional y Europeo. Desde EARA queremos informar acerca del papel que los animales desempeñan en la investigación, de los niveles de bienestar que los animales disfrutan en los centros de investigación, de la normativa que regula su uso y de los beneficios obtenidos tanto para humanos como para animales. Fundamental para alcanzar un clima favorable es fomentar una comunicación transparente dirigida al público por parte de la comunidad científica. La opinión pública es más receptiva a apoyar el uso de animales en investigación para fines médicos cuando recibe información precisa procedente de fuentes relevantes. Varias encuestas de opinión realizadas en Inglaterra, Italia y a nivel Europeo han mostrado que podemos mantener el apoyo de la población hacia el uso de animales en experimentación en tanto en cuanto se proporcione información clara y transparente. El público tiene derecho a preguntarse sobre las investigaciones que se llevan a cabo en centros gubernamentales, ya que es el dinero del contribuyente el que subvenciona estos proyectos. Por esta misma razón, es imperativo que los centros de investigación participen en el dialogo con el ciudadano acerca de cómo y porqué se usan animales en experimentación, y se aseguren de esta manera que la información que circula sea veraz y precisa. Como bien dice el eslogan del programa de divulgación científica 'Entre Probetas' de Radio 5 Radio Nacional de España, dirigido por José Antonio López Guerrero del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 'lo que deje de decir la ciencia, lo dirá la pseudociencia'. La falta de divulgación científica en referencia a este tema sólo contribuye a empeorar la situación actual en la que el debate está controlado mayoritariamente por aquellos grupos que se oponen a esta práctica y cuyo objetivo es promover la desconfianza entre los ciudadanos con el fin de abolir el uso de modelos animales en experimentación.

Desde que EARA empezara a colaborar con organizaciones líderes en Europa en investigaciones biomédicas, hemos conseguido un importante progreso. Nuestros socios alemanes han recibido con entusiasmo nuestra iniciativa de promover una comunicación más transparente en torno a este tema. Como resultado, muchas de estas organizaciones están abriendo sus puertas a políticos y parlamentarios para que comprueben las excelentes condiciones que los animales disfrutan en estas instalaciones y para conocer las razones que explican el uso de animales en investigación. Este año vamos a impartir varios seminarios acerca de cómo mejorar la transparencia en la

comunicación de la experimentación animal para el gabinete de comunicación de la mayor agencia pública de investigación en Alemania. En Italia, hemos ayudado a lanzar, junto con nuestros socios italianos, la plataforma 'Research4Life' para proporcionar información precisa y actual sobre la experimentación con animales. Desde esta plataforma, junto con el esfuerzo de otras organizaciones regionales y nacionales, se están coordinando visitas de parlamentarios italianos a centros de investigación. La organización de visitas de europarlamentarios a centros de investigación es una de las actividades clave que EARA está coordinando en varios países de Europa con motivo de la iniciativa de los ciudadanos europeos 'Stop vivisection'. En Bruselas, estamos organizando una reunión con centros de investigación y organizaciones líderes en biomedicina con objeto de encontrar una estrategia común para mejorar la opinión pública.

A pesar de los avances conseguidos hasta el día de hoy, todavía hay un largo camino por recorrer para alcanzar un mayor apoyo por parte de los ciudadanos y políticos a la investigación biomédica con animales. Basta echar una simple mirada a las páginas web de instituciones y centros de investigación para apreciar la evidente falta de información proporcionada al público en referencia a este tema. En Inglaterra, donde algunas organizaciones en defensa de la experimentación biomédica llevan trabajando desde hace más de un siglo, más de la mitad de los centros de investigación, universidades y organizaciones de pacientes ofrecen declaraciones en sus páginas web acerca del uso de animales en sus proyectos científicos. El panorama en España no es tan alentador aún; sólo un bajo porcentaje de las páginas web de centros que realizan investigación con animales muestran un mensaje claro y accesible.

Nuestra misión desde EARA es clara: Queremos que investigaciones médicas importantes que contribuyen al progreso en biomedicina continúen siendo posibles en Europa; y queremos que los investigadores sean capaces de llevar a cabo estas investigaciones aquí sin ninguna coacción ni intimidación. Un elemento clave para conseguirlo es establecer coaliciones y ayudar a los centros de investigación a sentirse respaldados y asesorados en su responsabilidad de facilitar una comunicación accesible e inteligible acerca del uso de animales en sus proyectos de investigación. Desde EARA invitamos a todos los centros de investigación que usen animales para investigaciones científicas a formar parte de esta red pan-Europea para fomentar el apoyo al uso responsable de animales en biomedicina cuando éste sea

estrictamente necesario, cuando los beneficios esperados sean pertinentes y cuando no existan alternativas disponibles.

EARA es una asociación cuyos miembros son centros de investigación públicos y privados y organizaciones implicadas, directa o indirectamente, con el uso de animales en investigaciones científicas. Para más información sobre esta red pan-Europea en apoyo a la investigación biomédica con animales, visite www.eara.eu (información de contacto: esanchez@eara.eu)



Nueva molécula para tratar el Alzheimer

Un equipo de investigadores de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB), del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y de la Universidad de Barcelona (UB) ha conseguido probar con éxito en ratones transgénicos para la enfermedad de Alzheimer un fármaco multifocal (ASS234) que permite recuperar la memoria.

«El Alzheimer es un desorden neurológico con elevada incidencia en personas de avanzada edad con una patología neurodegenerativa compleja, que conlleva la pérdida progresiva de la capacidad cognitiva - memoria, lenguaje y aprendizaje - acompañada de trastornos psiquiátricos - ansiedad, depresión, apatía y agresividad -»

Los autores combinaron parte de la estructura del Donepecilo, fármaco más utilizado para tratar la enfermedad de Alzheimer pero con eficacia corta en el tiempo, y parte de la estructura del compuesto PF9601N, inhibidor de la enzima monoaminooxidasa B (MAO B) que ha demostrado un efecto neuroprotector en diferentes modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson.

Los investigadores midieron el efecto de ASS234 en estudios *in vivo* en ratones lesionados con escopolamina, sobre la recuperación de la memoria espacial mediante el laberinto acuático de Morris. Los resultados indican que ASS234 tiene un efecto neuroprotector y de recuperación de la memoria a corto plazo, hecho que confirma que la molécula estimula la transmisión colinérgica y monoaminérgica, transmisión que está afectada en la patología y que es la responsable de la pérdida de memoria y de funciones cognitivas.

Aunque aún se desconoce su etiología, las placas seniles, los ovillos neurofibrilares, los daños oxidativos en diferentes estructuras celulares y los bajos niveles de acetilcolina se convierten en agentes de gran relevancia en el desarrollo de la enfermedad.

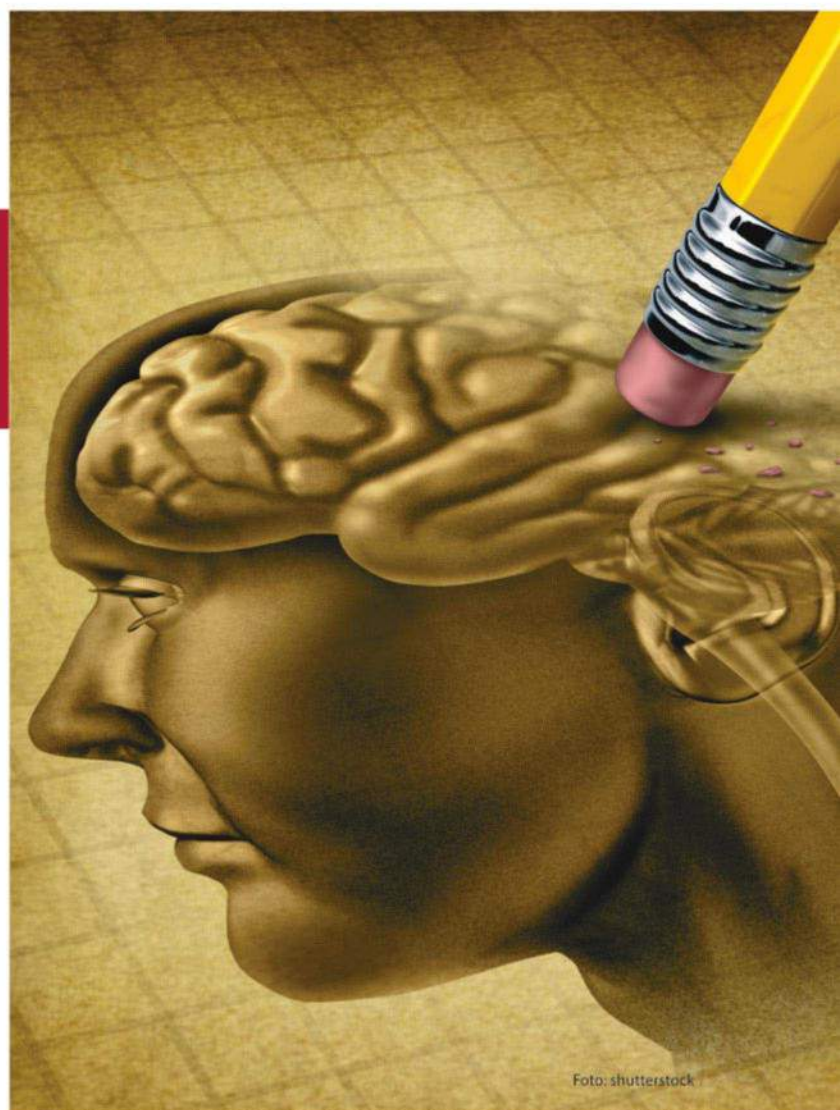


Foto: shutterstock

<http://www.europapress.es/catalunya/noticia-prueban-exito-ratones-molecula-tratar-alzheimer-20150206180145.html>

<http://www.gacetamedica.com/noticias-medicina/2015-02-13/especializada/buenos-resultados-de-la-molecula-ass234-en-ratones-contra-el-alzheimer/pagina.aspx?idart=892408>

Terapia génica contra el infarto de miocardio

Una investigación llevada a cabo desde el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), con la participación de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB), ha intentado por primera vez en ratones curar el infarto de miocardio mediante terapia génica.

La insuficiencia cardíaca es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. El envejecimiento es uno de los principales factores de riesgo en las enfermedades cardiovasculares, provocando cambios en el corazón, que lo hacen más propenso a fallar, y reduciendo su capacidad autoregenerativa.

La telomerasa es una enzima capaz de restablecer el reloj biológico de la célula mediante la reconstrucción de los telómeros, que se acortan cada vez que la célula se divide, hasta que llega un punto que están tan reducidos que ya no pueden realizar su función protectora, y es en ese momento que la célula deja de dividirse y envejece. El acortamiento de los telómeros provoca enfermedades asociadas con la edad, incluyendo la disfunción cardíaca tanto en ratones como en humanos. La telomerasa evita este acortamiento, pero en la mayoría de las células del organismo sólo lo hace antes del nacimiento; las células de un adulto, salvo excepciones, no tienen telomerasa.

Partiendo de que la telomerasa retarda el envejecimiento, los investigadores plantean la hipótesis que la telomerasa podría ser una estrategia terapéutica para curar las enfermedades asociadas al envejecimiento y prevenir de esta manera la insuficiencia cardíaca tras un infarto de miocardio.

Los investigadores expresaron la enzima telomerasa mediante la inoculación de un virus modificado en el corazón de unos ratones, a los que después se les indujo un infarto de miocardio. Tras el infarto, observaron que en los corazones que expresaban telomerasa aparecían menos dilataciones cardíacas, la función ventricular era mejor, las cicatrices debidas al infarto eran más pequeñas y aumentaba la supervivencia en un 17% respecto a los animales control.



Foto: shutterstock

« Los investigadores del CNIO han diseñado una estrategia del todo innovadora, una terapia génica que reactiva el gen de la telomerasa en el corazón de los ratones adultos y aumenta así en un 17% la supervivencia de estos animales después de un infarto »

Todo indica que estos corazones con telomerasa están regenerando los cardiomiocitos, objetivo largamente buscado por las terapias post-infarto. Esta regeneración del músculo cardíaco contrarrestaría la formación de la cicatriz causada por el infarto. No obstante, el éxito del tratamiento es modesto, ya que la tasa de mortalidad dentro del mismo año del infarto de miocardio sigue siendo alta, con lo que serían necesarias nuevas dianas terapéuticas y tratamientos más eficaces.

Los autores del estudio esperan poder aplicar tan pronto como sea posible esta terapia génica en cerdos como paso previo a un ensayo en humanos.

<http://www.uab.cat/web/sala-de-premsa/detall-de-noticia/terapia-genica-contra-l-infart-de-miocardio-1345667174054.html?noticiaid=1345679619686>

Bär C., Bernardes de Jesus B., Serrano R., et al. *Telomerase expression confers cardioprotection in the adult mouse heart after acute myocardial infarction*. Nature Communications 2014, 5:5863. doi:10.1038/ncomms6863.

Roedores inmunes al cáncer

Los miembros de la especie *Heterocephalus glaber* son roedores pequeños, subterráneos y carentes de pelo, que nunca desarrollan cáncer. Debido a ello, han sido objeto de interés por la comunidad científica. En un estudio reciente se ha identificado una proteína que según todos los indicios es la responsable de la enorme diferencia entre el humano y este animal en cuanto a incidencia del cáncer.

«Genéticamente, el *Heterocephalus glaber* posee dos sistemas de defensa contra el cáncer. Uno de ellos es el mismo que el de los humanos, la expresión del gen p27 y que se denomina "inhibición por contacto", sistema que las células cancerígenas son capaces de ignorar, proliferando indefinidamente. Pero el *Heterocephalus glaber* presenta adicionalmente un mecanismo que actúa antes, dejando a este sistema sólo de reserva»

Las células del animal liberan ácido Hialurónico de alto peso molecular (HMW-HA) que impide la propagación de posibles tumores.

El grupo de genes encontrado en estos roedores codifica para un total de cuatro proteínas anticáncer, mientras que en humanos y ratón codifica solo para tres proteínas. Ya se sabía que los genes en cuestión sintetizan las mismas tres proteínas supresoras de cáncer en estas especies: p15INK4b, p16INK4a y ARF, que impiden a las células dividirse cuando se estresan o mutan.

Un equipo de la Universidad de Rochester en Nueva York, ha descubierto en el *Heterocephalus glaber* la presencia de una cuarta proteína, resultado de la fusión de p15INK4b y p16INK4a.

A este nuevo compuesto se le ha dado el nombre de pALTINK4a/b y se cree que éste es el mecanismo que marca la diferencia entre la incidencia del cáncer en la especie humana y la asombrosa inmunidad al mismo que poseen esos roedores.

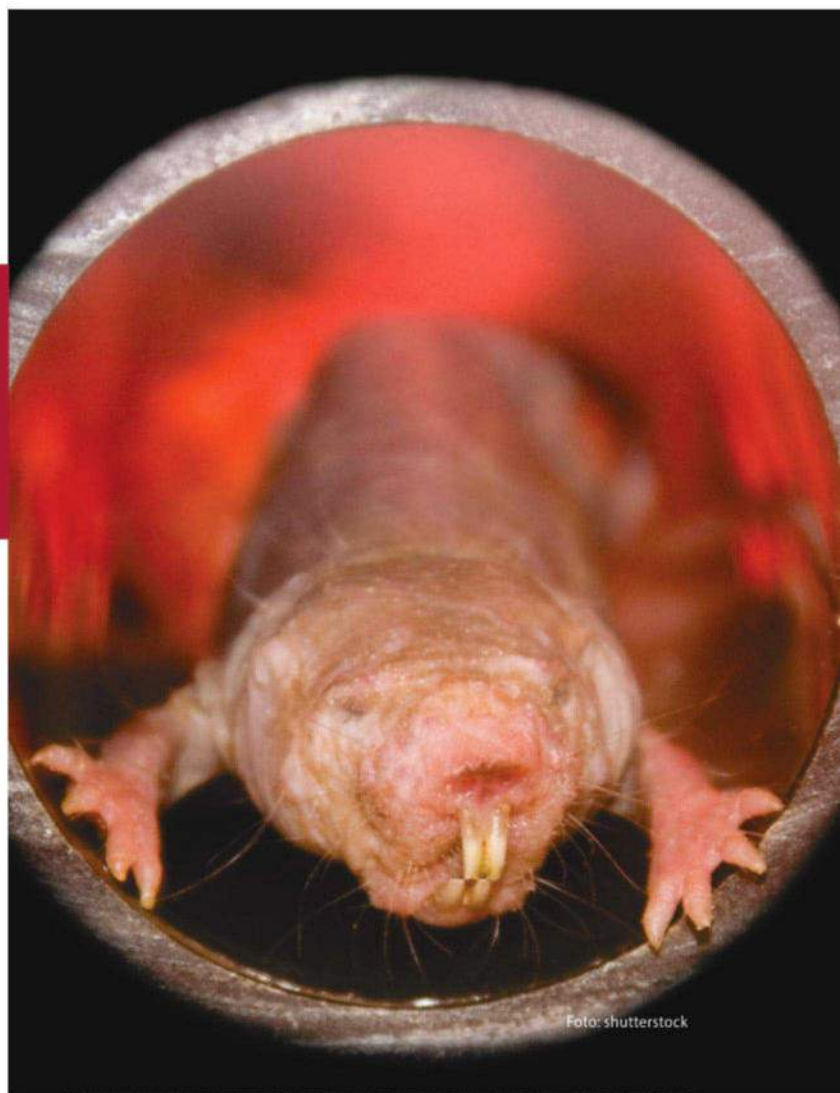


Foto: shutterstock

<http://noticiasdelaciencia.com/not/12612/descubren-la-proteina-que-puede-explicar-la-inmunidad-de-un-roedor-al-cancer/>

Tiana X., Azpurua J., Kea Z., et al. **NK4 locus of the tumor-resistant rodent, the naked mole rat, expresses a functional p15/p16 hybrid isoform.** PNAS 2015, 112(4):1053-8. doi/10.1073/pnas.1418203112.

El hígado graso responde peor ante una infección bacteriana que uno sano

Un equipo de investigadores del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y del Hospital Universitario Fundación de Alcorcón ha estudiado cómo la obesidad afecta a las principales rutas metabólicas del hígado y a la respuesta inmune.

Para estudiar las afecciones que provoca el hígado graso, los investigadores modificaron la dieta de peces cebras (*Danio rerio*) y analizaron cómo afectó la obesidad a las principales rutas metabólicas del hígado y a su respuesta inmune. El grupo de peces sobrealimentados desarrolló obesidad, mostró signos de inflamación progresiva de hígado y experimentó una regulación génica similar a la observada en humanos con estas dolencias.

Los resultados, publicados en la revista *Journal of Endocrinology*, muestran que un hígado graso no responde ante un estímulo inflamatorio agudo como una infección bacteriana del mismo modo que un hígado sano. Ésta podría ser una de las claves del proceso que hace que la enfermedad del hígado graso no alcohólico, proceso presuntamente benigno, pueda convertirse en cáncer hepático.

«La obesidad es la principal causa de la enfermedad del hígado graso no alcohólico, un trastorno generalmente benigno basado en la filtración de grasa en el hígado, pero con capacidad de desarrollar cirrosis y evolucionar progresivamente hacia el hepatocarcinoma. Se trata de la principal causa de dolencia hepática crónica en el mundo occidental»

Para los investigadores, el conocimiento de los procesos diferenciales que se llevan a cabo en un hígado graso respecto a un hígado sano son de una gran importancia para entender cómo un proceso presuntamente benigno puede complicarse hasta producir un riesgo importante para la salud de quien lo padece.

<http://www.agenciasinc.es/Noticias/El-higado-graso-responde-peor-ante-una-infeccion-bacteriana-que-uno-sano>

Forn-Cuní G., Varela M., Fernández C.M., Figueras A., and Novoa B. *Liver immune responses to inflammatory stimuli in a diet-obesity model of zebrafish*. *Journal of Endocrinology*. 2014. doi:10.1530/JOE-14-0398.



El método CARD se consolida como el mejor protocolo de tecnología de la reproducción de ratón

Toru Takeo y Naomi Nakagata

Division of Reproductive Engineering, Center for Animal Resources and Development (CARD), Kumamoto University, 2-2-1 Honjo, Chuo-ku, Kumamoto 860-0811, Japan

Resumen

Actualmente existe una gran cantidad de embriones y esperma de ratones modificados genéticamente (RMG) que se encuentran criopreservados en bancos de recursos genéticos establecidos en diferentes laboratorios del mundo. Las técnicas de criopreservación de embriones y esperma han contribuido a la organización de la producción, preservación y envío eficiente de los ratones almacenados en estos bancos. En nuestro centro, el *Center for Animal Resources and Development (CARD)* de la *Kumamoto University*, uno de los bancos genéticos de ratón más grandes de Japón, hemos desarrollado varias técnicas de criopreservación de embriones, de esperma y de ovocitos, así como también de almacenaje en frío de embriones y esperma, y su posterior utilización en fertilización *in vitro* (FIV). Para ello, hemos tenido que superar varios problemas críticos de la tecnología reproductiva del ratón, tales como la baja fertilidad del esperma criopreservado de la cepa C57BL/6, la variabilidad en la viabilidad y en la capacidad de fertilización de los ovocitos criopreservados, y la duración limitada de los embriones o esperma mantenidos en frío.

En la actualidad, las técnicas desarrolladas en nuestro laboratorio están ampliamente reconocidas por la comunidad científica. En este artículo, presentamos una serie de técnicas desarrolladas por nuestro equipo bajo el nombre de Método CARD.

Introducción

La criopreservación de células y órganos de la reproducción es útil para salvaguardar material genético de los animales de laboratorio. Como ya hemos comentado, existen bancos de recursos genéticos en los que se mantienen criopreservados embriones y esperma de RMG (1).

A día de hoy, hay más de 30.000 líneas de RMG archivadas en los bancos de recursos genéticos, a cuyos datos se puede acceder por medio de la *International Mouse Strain Resource (IMSR)*, que es una colaboración multiinstitucional que apoya el uso de RMG para el estudio de la biología y las enfermedades humanas (2). A través de este archivo, los investigadores pueden obtener los ratones de su interés o bien, depositar sus propios animales para compartirlos con la comunidad científica (ver Figura 1).

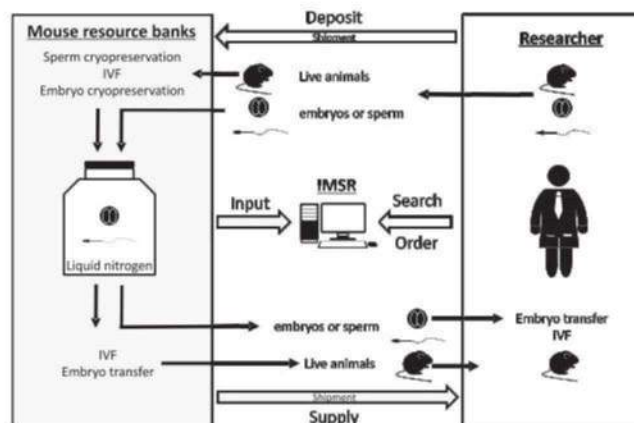


Figura 1.- Esquema de depósito o suministro de ratones genéticamente modificados vía banco de recursos genéticos: El investigador puede depositar sus ratones en el banco de recursos y publicar la información de los ratones archivados en la web de la IMSR. Cualquier investigador puede hacer una búsqueda y solicitar los ratones archivados a través del sistema. En el banco de recursos, los ratones están archivados en forma de esperma o embriones criopreservados. Para el depósito o la distribución, los ratones son transportados como animales vivos o como embriones o esperma criopreservado o refrigerado.

Nuestro centro (CARD) fue creado con un objetivo específico en el manejo de los animales de experimentación, dentro de un centro internacional de investigaciones biomédicas que utiliza RMG desde el año 1998 (3,4). El centro CARD es socio fundador de la *Federation of International Mouse Resource (FIMRe)*, de la *Asian Mouse Mutagenesis and Resource Association (AMMRA)* y contribuye con la actividad del IMSR. Desde su creación, hemos producido o archivado más de 2.000 líneas de RMG, accesibles a la

comunidad científica a través del banco de recursos genéticos de ratón de Japón. Para manejar eficientemente el número de muestras acumuladas de RMG, nos hemos centrado en el desarrollo de nuevas técnicas aplicables a la reproducción del ratón. De esta manera, nuestras técnicas de criopreservación de embriones, espermatozoides y ovocitos, y otras técnicas relacionadas, pueden mejorar la eficiencia de la preservación o transporte de las muestras criopreservadas, y generar ratones vivos a partir de estas muestras.

Actualmente, nuestros protocolos de criopreservación de embriones, espermatozoides y ovocitos, así como los de mantenimiento refrigerado de embriones y espermatozoides, y la fertilización *in vitro* (FIV), son empleados por varios institutos alrededor del mundo. Además, recientemente hemos ofrecido cursos a nivel internacional sobre tecnología de la reproducción del ratón con el objetivo de compartir nuestro conocimiento y las técnicas creadas en nuestro laboratorio. En este artículo, presentaremos las técnicas y aplicaciones para el manejo eficiente de los RMG.

Criopreservación de embriones

Esta técnica se ha utilizado tradicionalmente para mantener con eficiencia y preservar líneas de ratones en bancos de embriones (5). La ventaja de preservar líneas de ratón mediante la congelación de embriones es que las crías producidas o recuperadas tendrán el mismo genotipo. Además, gracias a esta técnica, el riesgo de perder las líneas por un desastre, fuego, o por contaminación genética queda controlado; el espacio, el trabajo, y el coste de estabulación están minimizados, y el envío de estos ratones a otros investigadores se ve simplificado (6).

Desde sus comienzos, en el laboratorio CARD hemos producido y archivado mediante la criopreservación más de 1.000.000 de embriones de RMG, en el estadio de 2-células. Los embriones se criopreservaron mediante el método de vitrificación desarrollado por nuestro grupo (7). Este método tiene muchas ventajas: el procedimiento es muy simple y rápido, no se necesita ningún instrumento especial para controlar el descenso de la temperatura, y los resultados obtenidos son muy estables y con una alta tasa de supervivencia.

Para la vitrificación de embriones, los embriones en el estadio de 2-células obtenidos por FIV, o por lavado del oviducto tras el apareamiento, se embeben de forma secuencial en dos tipos de

agentes crioprotectores (1-M DMSO en PB1; y DAP213: constituido por 2-M DMSO, 1-M acetamida y 3-M propilenglicol en PB1), en criotubos. El tubo que contiene los embriones ya preparados se sumerge directamente en el nitrógeno líquido. A continuación, se descongelan los embriones vitrificados mediante la dilución del medio en alícuotas de 0.25 M de sacarosa en PB1 a 37°C. Habitualmente, más del 80% de los embriones sobreviven al proceso de vitrificación y al descongelado del mismo. Finalmente, los embriones que sobreviven se transfieren a una hembra pseudogestante para llevar a cabo la gestación de los mismos y generar las crías (8).

Criopreservación de espermatozoides

La criopreservación de espermatozoides es la forma más eficiente para archivar material de RMG en un banco de recursos genéticos de ratón (9). Las ventajas de la congelación de espermatozoides son que el almacenaje y el envío de las líneas de ratón es eficiente, que el procedimiento de congelación es mucho más simple que la congelación de embriones, y que las muestras pueden ser rápidamente preservadas sin la ayuda de equipos especiales y sin una gran experiencia previa. De esta forma, y a partir de un sólo macho, se pueden producir más de 2.000 ratones con el espermatozoides recogido y archivado en pajuelas.

En nuestro centro, hemos preparado y preservado más de 31.000 pajuelas derivadas de RMG. Para mejorar el funcionamiento del banco, hemos mejorado varias de las técnicas de congelación de espermatozoides y de FIV usando ese espermatozoides congelado. Uno de los mayores problemas del espermatozoides de ratón criopreservado es la baja tasa de fertilidad (0-20%), especialmente en la cepa C57BL/6, que es una cepa consanguínea muy bien establecida y utilizada comúnmente como fondo genético para los RMG (10,11,13).

Hemos mejorado globalmente el proceso de congelación de espermatozoides, estableciendo un protocolo original para la congelación que emplea un crioprotector en base a 18% de rafinosa pentahidrato y 3% de leche descremada (R18S3), un protocolo conocido como el Método de Nakagata (11,14-17). Además, hemos descubierto que un suplemento de 100-mM de L-glutamina asociado al R18S3 (mR18S3) potencia los efectos protectores e incrementa la tasa de fertilidad del espermatozoides descongelado del ratón C57BL/6 (18). Posteriormente, hemos desarrollado un medio de pre-incubación para el espermatozoides, con metil- β -ciclodextrina (MBCD), que promueve eficientemente la

capacitación del espermatozoides del ratón C57BL/6 descongelado, facilitando el flujo del colesterol de su membrana (19). El medio de fertilización contiene glutatión reducido (GSH) que estimula la penetración del espermatozoides alterando la estructura de la zona pelúcida, y por lo tanto, mejora la tasa de fertilidad del espermatozoides descongelado (20). Por otro lado, el tratamiento de los ovocitos madurados *in vitro* con GSH también incrementa la tasa de fertilización en la FIV usando espermatozoides descongelado (21). También hemos desarrollado un método de FIV para el rescate de espermatozoides congelado siguiendo otros métodos clásicos de criopreservación (22).

A continuación describiremos brevemente la criopreservación de espermatozoides y la FIV usando espermatozoides congelado o descongelado (20). El espermatozoides se obtiene directamente de la cola del epidídimo de un ratón eutanasiado y se introduce en una gota de medio mR18S3. La suspensión de espermatozoides se coloca en una pajuela para su congelación. A su vez, las pajuelas se colocan en un flotador sobre el nitrógeno líquido durante 10 minutos y después se las sumerge y mantiene en nitrógeno líquido. Antes de realizar la FIV, el espermatozoides se descongela y se atempera en un baño a 37°C. La suspensión de espermatozoides se combina e incuba en el medio TYH con 0.75-mM MBCD; después, se añade el espermatozoides a la gota del medio de fertilización mHTF con GSH que ya contiene los complejos cúmulos-ovocitos recolectados de las hembras superovuladas. A las 3 horas post-inseminación, se transfieren los ovocitos y se cultivan en mHTF durante toda la noche para obtener, al día siguiente, los embriones a 2-células. Normalmente, la tasa de fertilización en RMG con fondo genético de C57BL/6, al igual que con otras cepas importantes de ratón, es superior al 80%.

Criopreservación de ovocitos

La criopreservación de ovocitos ofrece una forma eficiente de preservar el material genético procedente de hembras y, a su vez, es una fuente útil de ovocitos para producir descendencia de RMG usando FIV [23]. Las ventajas de la criopreservación de ovocitos son que el almacenaje y el transporte de las líneas de ratones son eficientes, que el período de cría de las donantes de ovocitos se puede minimizar, y que el ovocito se puede utilizar en cualquier momento.

Hemos publicado varios estudios sobre la criopreservación de ovocitos de ratón por medio del método de vitrificación, y de la FIV entre ovocitos preservados y espermatozoides fresco, enfriado o

congelado (23-25). Hemos superado la baja fertilidad de los ovocitos de la cepa C57BL/6 mediante la adición de MBCD y GSH en la FIV. La viabilidad, fertilidad y desarrollo de los ovocitos vitrificados y descongelados mejoraron acortando el tiempo de exposición a la enzima hialuronidasa, durante el tratamiento para eliminar las células del cúmulo que los rodea (26). El uso del láser para perforar la zona pelúcida de los ovocitos criopreservados también ha resultado efectivo para mejorar la tasa de fertilidad (27). Además, los ovocitos criopreservados pueden usarse para producir de manera eficiente embriones por ICSI - inyección intracitoplasmática de espermatozoides (28). Por otro lado, mediante la criopreservación de ovocitos fertilizados se ha facilitado su disponibilidad para la modificación genómica por medio de las endonucleasas como el TALEN (29).

El procedimiento de la vitrificación de ovocitos es esencialmente el mismo que se ha descrito para la vitrificación de embriones. Normalmente, la tasa de supervivencia de los ovocitos vitrificados y descongelados es de más del 90%, con una tasa de fertilidad del 70% por FIV usando la combinación de MBCD y GSH.

Mantenimiento en frío de embriones de 2-células

El almacenamiento en frío de los embriones de ratón en estadio de 2-células es una alternativa válida al transporte de animales vivos o embriones y espermatozoides congelados (30). Las ventajas de los embriones almacenados en frío son que se elimina la necesidad de aprender técnicas especiales para manipular las muestras, que los embriones se envían a temperaturas refrigeradas, y que el coste del envío se reduce considerablemente en comparación con el envío de animales vivos o muestras congeladas. De todas formas, el transporte de muestras almacenadas en frío es una técnica nueva de envío de embriones de los RMG archivados en nuestros bancos de recursos genéticos.

En un primer momento logramos transportar embriones en estadio de 2-células mantenidos en el oviducto sumergido en medio PB1 y conservado a 4°C (31). Después, descubrimos que el medio M2 prolonga muy bien la viabilidad y el desarrollo de los embriones de 2-células mantenidos a temperaturas refrigeradas durante 72 h (30). Así, demostramos que los embriones de 2-células vitrificados y descongelados, o los embriones de 2-células producidos por FIV utilizando espermatozoides criopreservados, muestran una capacidad de desarrollo, después de su almacenaje en frío, similar a aquellos embriones de 2-células producidos *in vivo* (32).

En nuestro protocolo de almacenamiento en frío de embriones de ratón en estadio de 2-células (30), los embriones se transfieren a un tubo de 0.5 mL con 0.6 mL de medio M2. El tubo se coloca en el kit CARD para transporte en frío (Kyudo-006-EX, Cosmo Bio Co. Ltd.) y la caja de transporte se envía en condiciones refrigeradas a través de una empresa de mensajería. Los embriones recibidos en el centro de destino pueden usarse para una transferencia embrionaria y obtener así, crías vivas.

Almacenaje de espermatozoides en frío

El mantenimiento en frío del espermatozoides de ratón es la forma más simple de transportar RMG (33). Las ventajas del almacenamiento en frío son que la recolección de la muestra es fácil, que el envío de las muestras es eficiente, que la viabilidad del espermatozoides se mantiene por más tiempo que los embriones refrigerados, y que una vez recibido el espermatozoides refrigerado se puede criopreservar.

El envío del epidídimo con su espermatozoides mantenido en frío se está utilizando en el banco de recursos genéticos de ratón del CARD. Hasta la fecha, hemos almacenado en frío más de 250 muestras de espermatozoides de RMG que hemos recibido, procesado y obtenido embriones de 2-células. Para establecer un sistema de transporte del espermatozoides refrigerado, hemos evaluado distintos medios. De esta manera, hemos encontrado que el medio de perfusión Lifer (Lifeblood Medical, Inc.) prolonga el periodo de capacidad de alta fertilidad en el espermatozoides refrigerado (33). Además, la tasa de fertilidad por FIV utilizando espermatozoides refrigerado fue potenciada con el tratamiento de MBCD y GSH. También se ha utilizado la perforación de la zona pelúcida con láser para aumentar la tasa de fertilidad del espermatozoides refrigerado (34). Por otro lado, la suplementación del medio de perfusión Lifer con esfingosina-1-fosfato (S1P) mejora la capacidad fecundante del espermatozoides criopreservado, después de haber sido refrigerado (35).

A continuación describiremos, de forma somera, el protocolo de almacenamiento de espermatozoides de ratón mediante la obtención y refrigeración de la cola del epidídimo (35): de un macho adulto (>12-semanas) se obtienen las colas del epidídimo (*Cauda epididymides*) y se colocan en un tubo de centrifuga de 0.2-mL que contenga 0.2 mL del medio Lifer, suplementado con 10 M S1P. El tubo se coloca en el kit CARD para transporte en frío (Kyudo-006-EX, Cosmo Bio Co. Ltd.) y la caja una vez cerrada se envía refrigerada a través de una compañía de transporte. Tras su recepción, se obtiene el espermatozoides de las colas de epidídimo y se utiliza para FIV o para criopreservar.

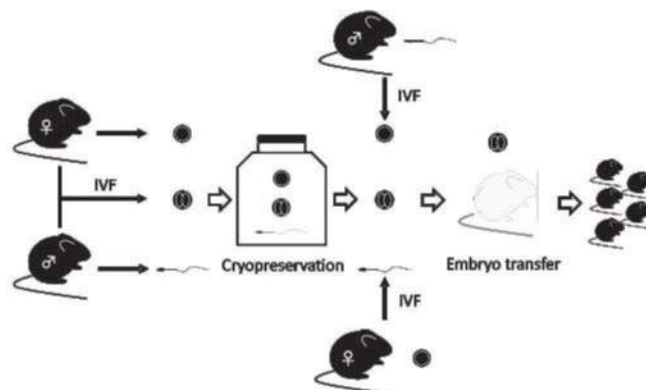


Figura 2.- Producción animal usando embriones o gametos criopreservados: Los embriones de 2-células, ovocitos o espermatozoides se criopreservan mediante los métodos descritos. Las muestras se mantienen en tanques de nitrógeno líquido a -196°C . Los ovocitos vitrificados y descongelados o el espermatozoides congelado y descongelado se usan en la FIV para producir embriones de 2-células. A continuación, los embriones se transfieren a una hembra receptora para obtener las crías buscadas.

Síntesis

La criopreservación de espermatozoides y embriones y sus técnicas relacionadas optimizan la producción, conservación y distribución eficiente de RMG (ver Figura 2). En el sistema CARD, hemos mejorado continuamente las técnicas de reproducción asistida del ratón para establecer el mejor y más eficiente sistema de producción, preservación y transporte de los RMG, con el fin de optimizar su uso para la investigación en ciencias biomédicas. Todos los protocolos de nuestras técnicas están publicados en nuestra web: (<http://card.medic.kumamoto-u.ac.jp/card/english/sigen/index.html>).

También hemos impartido cursos nacionales e internacionales de educación y entrenamiento en técnicas de reproducción asistida de ratón, con objeto de compartir conocimientos y técnicas. En la actualidad, estas técnicas están mundialmente reconocidas por la comunidad científica. Creemos firmemente que el compartir la tecnología aumenta el acceso a ratones genéticamente modificados de modo que se acelerará la investigación aplicada en ratón, permitiendo el descubrimiento de nuevas estrategias para mejorar la salud humana.

Agradecimientos

Un sincero agradecimiento a nuestro personal: Kiyoko Fukumoto, Tomoko Kondo, Yukie Haruguchi, Yumi Takeshita, Yuko Nakamura, Tomoko Umeno, Ai Miyagawa, Mari Iwamoto, Fumi

Takahashi, Eri Kohagura, Shuuji Tsuchiyama y Yoshiko Nakagawa; y también a nuestros estudiantes: Yoshimoto Hidetaka, Satohiro Nakao, Mai Hachiya, Yuki Sakai, Yoshiko Maeda, Yuka Horikoshi, Yumiko Hirose, Shiori Takeuji, y Ayumi Mukunoki, por el apoyo técnico y por sus valiosas opiniones.

Expresamos nuestra profunda gratitud al Dr. Jorge Sztejn por su especial apoyo y asesoramiento en la edición de nuestro artículo y en su traducción del inglés al español.

Un especial agradecimiento al Dr. Josep M^a Marimon Escude por la lectura, comentarios y edición de la traducción.

BIBLIOGRAFÍA

1. Donahue L.R., Hrabe de Angelis M., Hagn M., et al. *Centralized mouse repositories*. *Mamm Genome* 2012, 23:559-71.
2. Eppig J.T. and Strivens M. *Finding a mouse: the International Mouse Strain Resource (IMSR)*. *Trends Genet* 1999, 15:81-2.
3. Nakagata N. and Yamamura K. *Current activities of CARD as an international core center for mouse resources*. *Exp Anim* 2009, 58:343-50.
4. Nakagata N. *Mouse Bank at CARD Kumamoto University, Japan*. *Interdisciplinary Bio Central* 2010, 2:1-4.
5. Whittingham D.G. *Embryo banks in the future of developmental genetics*. *Genetics* 1974, 78:395-402.
6. Landel C.P. *Cryopreservation of mouse gametes and embryos*. *Methods Enzymol* 2010, 476:85-105.
7. Nakao K., Nakagata N., and Katsuki M. *Simple and efficient vitrification procedure for cryopreservation of mouse embryos*. *Exp Anim* 1997, 46:231-4.
8. Nakagata N. *Embryo transfer through the wall of the fallopian tube in mice*. *Jikken Dobutsu* 1992, 41:387-8.
9. Nakagata N. *Cryopreservation of mouse spermatozoa and in vitro fertilization*. *Methods Mol Biol* 2011, 693:57-73.
10. Sztejn J.M., Farley J.S., and Mobraaten L.E. *In vitro fertilization with cryopreserved inbred mouse sperm*. *Biol Reprod* 2000, 63:1774-80.
11. Nakagata N. *Cryopreservation of mouse spermatozoa*. *Mamm Genome* 2000, 11:572-6.
12. Sztejn J.M., Noble K., Farley J.S., and Mobraaten L.E. *Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation*. *Cryobiology* 2001, 42:28-39.
13. Nishizono H., Shioda M., Takeo T., et al. *Decrease of fertilizing ability of mouse spermatozoa after freezing and thawing is related to cellular injury*. *Biol Reprod* 2004, 71:973-8.
14. Takeshima T., Nakagata N., and Ogawa S. *Cryopreservation of mouse spermatozoa*. *Jikken Dobutsu* 1991, 40:493-7.
15. Nakagata N., Matsumoto K., Anzai M., et al. *Cryopreservation of spermatozoa of a transgenic mouse*. *Jikken Dobutsu* 1992, 41:537-40.
16. Nakagata N. and Takeshima T. *Cryopreservation of mouse spermatozoa from inbred and F1 hybrid strains*. *Jikken Dobutsu* 1993, 42:317-20.
17. Nakagata N. *Use of cryopreservation techniques of embryos and spermatozoa for production of transgenic (Tg) mice and for maintenance of Tg mouse lines*. *Lab Anim Sci* 1996, 46:236-8.
18. Takeo T. and Nakagata N. *Combination medium of cryoprotective agents containing L-glutamine and methyl- β -cyclodextrin in a preincubation medium yields a high fertilization rate for cryopreserved C57BL/6J mouse sperm*. *Lab Anim* 2010, 44:132-7.
19. Takeo T., Hoshii T., Kondo Y., et al. *Methyl- β -cyclodextrin improves fertilizing ability of C57BL/6 mouse sperm after freezing and thawing by facilitating cholesterol efflux from the cells*. *Biol Reprod* 2008, 78:546-51.
20. Takeo T. and Nakagata N. *Reduced glutathione enhances fertility of frozen/thawed C57BL/6 mouse sperm after exposure to methyl- β -cyclodextrin*. *Biol Reprod* 2011, 85:1066-72.
21. Ishizuka Y., Nishimura M., Matsumoto K., et al. *The influence of reduced glutathione in fertilization medium on the fertility of in vitro-matured C57BL/6 mouse oocytes*. *Theriogenology* 2013, 80:421-6.
22. Nakagata N., Takeo T., Fukumoto K., et al. *Rescue in vitro fertilization method for legacy stock of frozen mouse sperm*. *J Reprod Dev* 2014, 60:168-71.
23. Nakagata N., Takeo T., Fukumoto K., et al. *Applications of cryopreserved unfertilized mouse oocytes for in vitro fertilization*. *Cryobiology* 2013, 67:188-92.
24. Nakagata N. *High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification*. *J Reprod Fertil* 1989, 87:479-83.
25. Nakagata N. *Production of normal young following transfer of mouse embryos obtained by in vitro fertilization between cryopreserved gametes*. *J Reprod Fertil* 1993, 99:77-80.
26. Ishizuka Y., Takeo T., Nakao S., et al. *Prolonged Exposure to Hyaluronidase Decreases the Fertilization and Development Rates of Fresh and Cryopreserved Mouse Oocytes*. *J Reprod Dev* 2014, 60(6):454-9.
27. Anzai M., Nishiwaki M., Yanagi M., et al. *Application of laser-assisted zona drilling to in vitro fertilization of cryopreserved mouse oocytes with spermatozoa from a subfertile transgenic mouse*. *J Reprod Dev* 2006, 52:601-6.

Artículos

28. Sakamoto W., Kaneko T., and Nakagata N. *Use of frozen-thawed oocytes for efficient production of normal offspring from cryopreserved mouse spermatozoa showing low fertility.* *Comp Med* 2005, 55:136-9.
29. Nakagawa Y., Sakuma T., Nakagata N., et al. *Application of oocyte cryopreservation technology in TALEN-mediated mouse genome editing.* *Exp Anim* 2014, 63:349-55.
30. Takeo T., Kaneko T., Haruguchi Y., et al. *Birth of mice from vitrified/warmed 2-cell embryos transported at a cold temperature.* *Cryobiology* 2009, 58:196-202.
31. Kamimura E., Nakashima T., Ogawa M., et al. *Study of low-temperature (4 degrees C) transport of mouse two-cell embryos enclosed in oviducts.* *Comp Med* 2003, 53:393-6.
32. Takeo T., Kondo T., Haruguchi Y., et al. *Short-term storage and transport at cold temperatures of 2-cell mouse embryos produced by cryopreserved sperm.* *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2010, 49:415-9.
33. Takeo T., Tsutsumi A., Omaru T., et al. *Establishment of a transport system for mouse epididymal sperm at refrigerated temperatures.* *Cryobiology* 2012, 65:163-8.
34. Kaneko T., Fukumoto K., Haruguchi Y., et al. *Fertilization of C57BL/6 mouse sperm collected from cauda epididymides after preservation or transportation at 4 degrees C using laser-microdissected oocytes.* *Cryobiology* 2009, 59:59-62.
35. Takeo T., Fukumoto K., Kondo T., et al. *Investigations of motility and fertilization potential in thawed cryopreserved mouse sperm from cold-stored epididymides.* *Cryobiology* 2014, 68:12-7.



Foto: shutterstock



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



Criopreservación de ovario

Jorge Sztejn DVM PhD (jsztejn@gmail.com)

Consultor especializado en reproducción asistida y criopreservación. Barcelona, España

La criopreservación del ovario, al igual que otras tecnologías de reproducción asistida, es el producto de dos o más técnicas relacionadas para obtener un objetivo específico. En este caso, después de la criopreservación, la técnica más importante es el trasplante quirúrgico ortotópico del ovario, realizado por primera vez en ratón por Robertson en 1940(1). En el año 1945, Russell y Hurst(2), del Laboratorio Jackson (entonces conocido como el *Roscoe B. Jackson Memorial Laboratory*), publicaron en la revista *Science* su trabajo sobre el mantenimiento de ciertas cepas consanguíneas por medio de trasplantes ováricos. Años más tarde, en 1957, Stevens (3) publicó la modificación de la técnica vigente hoy en día, implantando sólo la mitad de un ovario de la donadora en la bolsa ovárica izquierda de una receptora previamente ovariectomizada.

La historia de la criopreservación de ovario tiene sus inicios a principios de 1930, cuando Lipschütz (4) expuso ovarios a temperatura ambiente y a temperaturas bajo cero. En ese estudio, los ovarios mantenidos a temperatura ambiente fueron hormonalmente funcionales después del injerto, mientras que en los ovarios congelados no se observó ninguna respuesta. Por esa razón, se generalizó el concepto de que el daño producido por el frío afectaba a los folículos ováricos (en los que se encuentran los ovocitos). Parkes y Smith (4) demostraron en 1953, que aunque los folículos de mayor tamaño estaban ciertamente afectados, los folículos primarios -después de embeber los ovarios en glicerol y congelarlos en hielo seco (nieve carbónica; -80°C)- eran capaces de restablecer el desarrollo una vez descongelados. Anecdóticamente, cuando estos investigadores utilizaron ovarios enteros de ratas no observaron desarrollo en el injerto y sin embargo, cuando utilizaron un trozo de ovario embebido en glicerol y posteriormente congelado a -80°C, los ovocitos parecían estar en buenas condiciones.

En 1960, Parrot (5) describió la congelación del ovario de ratón y el injerto ortotópico de un trozo del mismo dentro de la cápsula ovárica de una hembra de ratón previamente irradiada. De este experimento nacieron crías, demostrando por primera

vez la fertilidad de un trozo de ovario congelado y descongelado. La autora también comentó que la pieza ovárica no se podía mantener congelada más de 44 días. El uso de hembras receptoras irradiadas -Parkes (4) y Parrot (5)- fue un avance importante para evitar el rechazo inmunológico del tejido implantado.

Durante los años 90, la creciente popularidad de los ratones transgénicos como modelo animal hizo que el número de ratones producidos creciera exponencialmente, provocando la saturación de la capacidad de estabulación de muchas instituciones. Como posible opción para recuperar el espacio perdido, nace un interés (o necesidad) especial por la investigación y desarrollo de nuevas técnicas de criopreservación, con objeto de mantener las líneas de ratones sin necesidad de estabulación. Durante este periodo también se desarrollaron los nuevos métodos de criopreservación de espermatozoides de ratón.

La criopreservación del ovario es relevante, incluso, en la clínica humana, en la que se utiliza, por ejemplo, en casos de mujeres jóvenes que necesitan tratamiento antitumoral por radiación o quimioterapia y cuya fertilidad potencial puede verse afectada por el tratamiento. Por ello, congelar una biopsia de ovario obtenida antes del tratamiento y reimplantarla más tarde puede restablecer la fertilidad, o bien permitir recuperar los niveles hormonales endógenos normales (6,7,8).

En ratones, la criopreservación de ovario pone de manifiesto sus ventajas en casos en los que no se pueden archivar ni embriones ni espermatozoides y en líneas en las que los machos son infértiles, las hembras mueren muy jóvenes o tienen problemas en el parto (9).

Actualmente contamos con diferentes protocolos para la criopreservación de ovario. Las variaciones entre los distintos protocolos se encuentran en:

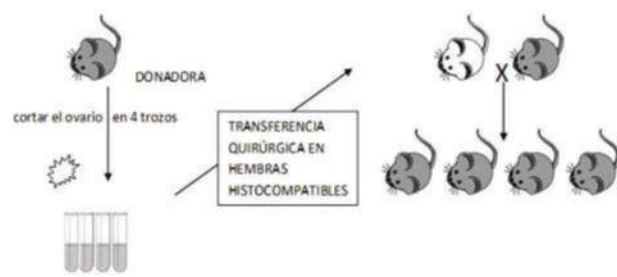
- i) el tamaño de la muestra a congelar, que puede ir desde el ovario entero (10,11,12), mitades (13), o rebanadas (5);
- ii) la edad de la donante, variando desde gónadas fetales (14), jóvenes (15), a ovarios adultos (11,13,16,17)
- iii) el método de congelación: lenta (13,18), semi-rápida (19) o vitrificación (16,20,21,22).
- iv) las soluciones crioprotectoras usadas, que van del glicerol al DMSO, propilenglicol, o etilenglicol, obteniéndose con todas ellas resultados aparentemente similares (23).

A finales de los 90, se desarrolló una técnica en los Laboratorios Jackson que obtuvo muy buenos resultados, utilizando DMSO como agente crioprotector (ACP) en criotubos y en combinación con un descenso de temperatura lento y equilibrado hasta llegar a -80°C (13). En este caso, se utilizó la misma curva de congelación empleada en ese momento para congelar embriones. Este estudio fue corroborado por un análisis histopatológico completo de los ovarios congelados y descongelados y en el que se observó que ciertamente los grandes folículos estaban afectados, y que los ovocitos inmaduros sobrevivían al proceso, demostrándose que después de la congelación-descongelación e implantación ortotópica, esa mitad de ovario era capaz de producir ovocitos fértiles. En otro experimento, y con el objetivo de comprobar que los ovocitos inmaduros de los folículos antrales sobrevivían a la criopreservación, el ovario criopreservado se sometió a maduración *in vitro*, seguida de una fertilización *in vitro* (FIV) de los ovocitos recolectados, que permitió obtener crías vivas (24).

En 2010 (19), se modificó la técnica de congelación para adaptarla al uso de pajuelas con dilución en un paso (25) utilizando propilenglicol (PROH) como ACP. Este cambio, después de implantar quirúrgicamente los trozos de ovario, superó los resultados originales obtenidos con el método lento. La ventaja de esta nueva metodología es que al usar el mismo programa de congelación (26) que se utiliza comúnmente para congelar embriones, permite que puedan llevarse a cabo ambos procesos al mismo tiempo.

En síntesis, el método consiste en obtener los ovarios de la hembra donante y una vez limpios de tejidos lindantes, se los secciona en mitades de manera que de una hembra obtenemos 4 trozos de ovario. Estas piezas se someten a distintos baños en

medios con concentraciones crecientes de soluciones crioprotectoras, con el fin de que esos medios penetren dentro del órgano de forma pasiva y protejan al tejido de una lesión térmica producida por las bajas temperaturas. Una vez conseguido, se colocan los trozos en un tubo o una pajuela, se sella y se expone a una congelación programada en la que la temperatura desciende de -7°C a -40°C a una velocidad de aproximadamente medio grado por minuto. Una vez terminado el programa se transfieren las muestras congeladas a un tanque de nitrógeno líquido para su almacenamiento final.



El trasplante quirúrgico del ovario consiste en transferir sólo una mitad del mismo (un cuarto de la dotación original) e implantarlo dentro de la bursa ovárica (bolsa ovárica) de una hembra ovariectomizada. Así pues, a la hembra receptora, bajo anestesia general, se le extirpa el ovario derecho y también el izquierdo, pero como este último será el lugar elegido para recibir el implante, la bursa ovárica deberá quedar intacta. De esta forma, una vez eliminado el ovario nativo, se coloca el trozo a implantar en la bursa vacía, sólo se cubre con el frágil tejido de la bursa (parte del peritoneo) y se finaliza cerrando la cavidad abdominal.

La hembra receptora debe compartir los antígenos H2 de histocompatibilidad de la donante para evitar los posibles rechazos inmunológicos; también es importante que su pelaje sea de diferente color que la de la donante, ya que esto permitirá identificar si las crías han nacido del ovario injertado, o de los vestigios del ovario nativo que hubiera quedado sin eliminar durante la cirugía. Por ejemplo: como donante la C57BL/6 negra, y como receptora la albina (C57BL/6BrdCrHsd-Tyr) o una agutí. Siete días después de la cirugía ya se la puede aparear. El número de crías de la camada no es grande, pero suficiente para recuperar la línea que se está tratando de rescatar.

Agradecimientos

Agradezco el trabajo realizado por Josep M^o Marimon Escude y Jordi Cantó Martorell con la aportación de sus valiosos comentarios y en la edición del texto.

BIBLIOGRAFÍA

1. Robertson G.A.G. *Ovarian transplantation in the house mouse*. Proc Soc Exp Biol Med 1940,44:302-4.
2. Russell W. and Hurst J. *Pure strain mice born to hybrids mother following ovarian transplantation*. Proc Natl Acad Sci USA 1945,31:267-73.
3. Stevens L.C. *A modification of Robertson's technique of homoiotopic ovarian transplantation in mice*. Transplant Bull 1957,4:267-73.
4. Smith A.U. *Biological Effects of Freezing and Supercooling*. Edward Arnold, Ltd. 1961, London.
5. Parrot D.M. *The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts derived from frozen tissue*. J Reprod Fertil 1960, 1:230-41.
6. Shaw J.M., Cox S.L., Trounson A.O., and Jenkin G. *Evaluation of the long-term function of cryopreserved ovarian grafts in the mouse, implications for human applications*. Mol Cell Endocrinol 2000, 161:103-10.
7. Roux C., Amiot C., Agnani G., et al. *Live birth after ovarian tissue autograft in a patient with sickle cell disease treated by allogeneic bone marrow transplantation*. Fertil Steril 2010, 93:2413.e15 9.
8. Silber S.J., Kagawa N., Kuwayama M., and Gosden R. *Duration of fertility after fresh and frozen ovary transplantation*. Fertil Steril 2010, 94:2191-6.
9. Szein J.M., McGregor T.E., Bedigian H.J., and Mobraaten L.E. *Transgenic mouse strain rescue by frozen ovaries*. Lab Anim Sci 1999, 49:99-100.
10. Harp R., Leibach J., Black J., et al. *Cryopreservation of murine ovarian tissue*. Cryobiology 1994, 31:336-43.
11. Gunasena K.T., Villines J.R.T., Critser E.S., and Critser J.K. *Live births after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries*. Hum Reprod 1997, 12:101-6.
12. Imhof M., Hofstetter G., Bergmeister H., et al. *Cryopreservation of a whole ovary as a strategy for restoring ovarian function*. J Assist Reprod Genet 2004, 21:459-65.
13. Szein J., Sweet H., Farley J., and Mobraaten L. *Cryopreservation and orthotopic transplantation of mouse ovaries: new approach in gamete banking*. Biol Reprod 1998, 58:1071-4.
14. Cox S.L., Shaw J., and Jenkin G. *Transplantation of cryopreserved fetal ovarian tissue to adult recipients in mice*. J Reprod Fertil 1996, 107:315-22.
15. Liu L., Wood G.A., Morikawa L., et al. *Restoration of fertility by orthotopic transplantation of frozen adult mouse ovaries*. Hum Reprod 2008, 23:122-8.
16. Hani T., Tachibe T., Shingai S., et al. *Fertility of mice receiving vitrified adult mouse ovaries*. J Reprod Fertil 2006, 131:681-7.
17. Liu L.J., Xie X.Y., Zhang R.Z., et al. *Reproduction and fertility in wild-type and transgenic mice after orthotopic transplantation of cryopreserved ovaries from 10-d-old mice*. Lab Anim 2008, 37:353-7.
18. Candy C.J., Wood C.J., and Whittingham D.G. *Restoration of a normal reproductive lifespan after grafting of cryopreserved mouse ovaries*. Human Reprod 2000, 15:1300-4.
19. Szein J., Vasudevan K., and Raber J. *Refinements in the cryopreservation of mouse ovaries*. J Am Assoc Lab Anim Sci 2010, 49:420-2.
20. Courbiere B., Odagescu V., Baudot A., et al. *Cryopreservation of the ovary by vitrification as an alternative to slow cooling protocols*. Fertil Steril 2006, 86(4 Suppl):1243-51.
21. Tokieda Y., Ishiwata I., Segino M., et al. *Establishment of a novel method for cryopreservation and thawing of the mouse ovary*. Hum Cell 2002, 15:230-7.
22. Wang Y., Xiao Z., Li L., et al. *Novel needle immersed vitrification: a practical and convenient method with potential advantages in mouse and human tissue cryopreservation*. Hum Reprod 2008, 23:2256-65.
23. Candy C.J., Wood C.J., and Whittingham D.G. *Effects of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries*. J Reprod Fertil 1997, 110:11-9.
24. Szein J.M., O'Brien M.J., Farley J.S., et al. *Rescue of oocytes from antral follicles of cryopreserved mouse ovaries: competence to undergo maturation, embryogenesis, and development to term*. Hum Reprod 2000, 15:567-71.
25. Leibo S.P. *One step in situ dilution method for frozen-thawed bovine embryos*. Cryo-Letters 1983, 4:387-400.
26. Renard J.P. and Babinet C. *High survival of mouse embryos after rapid freezing and thawing inside plastic straws with 1-2 propanediol as cryoprotectant*. J Exp Zool 1984, 230:443-8.

Bancos de embriones de ratón

Julia Fernández, DVM¹ y Dr. Lluís Montoliu²

¹ Responsable técnico del servicio de criopreservación de embriones del CNB y Nodo EMMA

² Investigador científico del CSIC, Director del nodo EMMA en España y coordinador del servicio de criopreservación de embriones del CNB

Introducción

Durante los últimos 35 años la comunidad científica internacional ha generado múltiples modelos animales, principalmente en ratón, para el estudio del genoma y enfermedades humanas. Desde la aparición de las primeras técnicas de modificación genética, a principios de los años 80, el ratón se ha convertido en la especie estrella en investigación con animales. Y esto ha sido así por su versatilidad y facilidad de estabulación y cría; por el conocimiento genético que se tiene de ella; por ser un mamífero relativamente parecido a otros, como los humanos; por su pequeño tamaño; y, principalmente, por la gran cantidad de técnicas y protocolos que permiten obtener ratones mutantes, transgénicos en definitiva, con su genoma alterado a voluntad, con objeto de entender el funcionamiento de los genes (genómica funcional), o para desarrollar un modelo que reproduzca, en su totalidad o en parte, alguna patología que nos afecte a nosotros, los humanos (biomedicina).

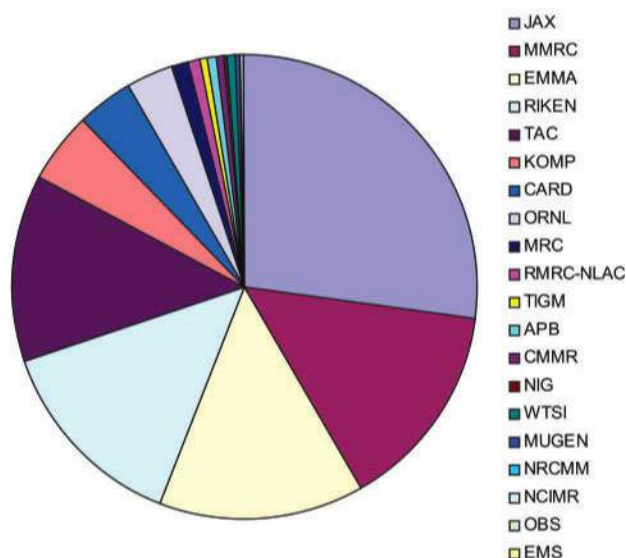
Todo el trabajo y esfuerzo que implica la obtención de cualquiera de estos ratones mutantes puede perderse si estos ratones, solamente, se mantienen como animales vivos en un núcleo de producción, en algún animalario del mundo. Los accidentes e incidentes, siempre inesperados, pueden llevarse por delante los resultados de investigación obtenidos tras años de experimentos. Por otro lado, la investigación científica también progresa mediante la validación, la reproducción de los resultados obtenidos por otros utilizando, en lo posible, los mismos reactivos, es decir, los mismos modelos animales. No parece lógico invertir en la producción de un ratón mutante que ya existe y ha sido generado, previamente, en alguna otra parte del mundo. Sin embargo, los efectos de la deriva genética pueden hacer cambiar un modelo animal, debido a la acumulación de nuevas mutaciones, al azar y de forma inadvertida. Por otro lado, frecuentemente resulta complicado compartir ratones entre instalaciones distintas, que operan bajo diferentes condiciones sanitarias, lo que convierte en necesaria una rederivación de las

líneas, habitualmente a partir de embriones. Finalmente, las nuevas normativas de bienestar animal y las legislaciones internacionales, europeas, nacionales que protegen el uso de animales en investigación, docencia y otros usos científicos obligan a todos los investigadores a razonar, explicar, presentar proyectos y obtener las correspondientes autorizaciones con objeto de: evitar su uso, en lo posible; minimizar el número de animales a utilizar, empleando solamente los necesarios para cada experimento; y mejorar los procesos de producción, mantenimiento y experimentación, teniendo siempre presente el bienestar animal.

Todas las razones anteriores justifican la existencia de los llamados bancos de embriones de ratón, o archivos, en los que se pueden criopreservar tanto embriones, como oocitos y espermatozoides de cada una de estas líneas de ratones mutantes para poder recuperarlos cuando sea necesario. Adicionalmente, la existencia de todas estas líneas de ratones mutantes, de interés en Biología y Biomedicina, en forma de material biológico congelado permite su distribución entre laboratorios y centros de investigación de forma mucho más eficiente, evitando la complejidad logística asociada al trasiego de animales vivos.

Los experimentos pioneros de Whittingham, Leibo y Mazur, publicados en 1972, demostraron que era posible congelar embriones de ratón en nitrógeno líquido para posteriormente descongelarlos, reimplantarlos en una hembra para su gestación, y finalmente obtener crías derivadas del material criopreservado. Desde entonces las técnicas de reproducción asistida y de criobiología han evolucionado formidablemente, con nuevos métodos que han aumentado progresivamente su fiabilidad y eficacia, y con contribuciones históricas de muchos centros, principalmente desde *The Jackson Laboratory (JAX)*, en EE.UU. En la actualidad, la frontera tecnológica en este campo la lidera el grupo del Dr. Naomi Nakagata, de la Universidad de Kumamoto (Japón), responsable de la División de Ingeniería Reproductiva del Centro de Recursos Animales y Desarrollo (CARD, card.medic.kumamoto-u.ac.jp/card/english/).

Existen diversos bancos de embriones de ratón en el mundo que operan de forma independiente, pero compartiendo y ofertando sus activos de forma conjunta a través de la iniciativa *International Mouse Strain Resource* (IMSR, www.findmice.org), alojada dentro de la gran base de datos, la *Mouse Genome Informatics* (MGI), en JAX. En la actualidad, hay casi 30.000 líneas de ratones mutantes congeladas en alguno de los 20 archivos que regularmente comparten sus bases de datos con IMSR. De ellas, más de un 25% están criopreservadas en JAX, seguido por MMRC, EMMA, RIKEN y TAC, con unas 4.000 líneas mantenidas en cada uno de estos grandes repositorios internacionales (ver gráfico).



En Europa, en los años 90, se creó el Archivo Europeo de Ratones Mutantes, conocido por sus siglas en inglés (EMMA: European Mouse Mutant Archive), hoy integrado dentro de la plataforma INFRAFRONTIER (www.infrafrontier.eu). Esta plataforma se ha financiado, principalmente, por la Unión Europea, a través de sucesivos proyectos de infraestructura, con ayuda de las instituciones nacionales y los propios centros de investigación o nodos que integran la red. En 2007, España se incorporó al consorcio EMMA a través del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), en Madrid, como miembro observador invitado, tras aportar un dossier con apoyos de muchos centros de investigación del país. El CNB cuenta con un servicio de criopreservación de embriones de ratón desde finales del 2005 (www.cnb.csic.es/~criocnb), pero además, aporta una extensa experiencia en criopreservación, a través del laboratorio de Lluís Montoliu, cuyas primeras actividades de criopreservación datan

de 1993, y de la actividad de Julia Fernández en estas técnicas en el animalario del CNB, desde 1997.

A partir de 2009, el CNB-CSIC pasó a formar parte de EMMA, como miembro de pleno derecho, ya incluido en el proyecto europeo *EMMAService*, que financió las actividades de EMMA entre 2009 y 2012. Seguidamente, la iniciativa EMMA se integró en la plataforma INFRAFRONTIER, que aúna las actividades de producción de modelos animales, criopreservación, archivo, distribución y fenotipación. En la actualidad, el proyecto INFRAFRONTIER-I3 (2013-2016) financia las actividades del archivo. El futuro de esta iniciativa es incierto, pues parece que será difícil renovar la financiación europea obtenida hasta el momento, pero existen ya soluciones y alternativas en marcha (como la empresa pública, sin ánimo de lucro, *Infrafrontier GmbH*, registrada en Alemania), que deberían permitir mantener, en lo posible, las actividades del archivo europeo de ratones mutantes.

El Archivo Europeo de Ratones Mutantes en España, el nodo del CNB

Cualquier investigador que haya generado un nuevo modelo animal, un nuevo ratón transgénico o mutante, una nueva combinación de genes de interés, o alguna línea de interés en un nuevo fondo genético es bienvenido e invitado a depositar estos animales en EMMA, siempre y cuando sea el propietario de la misma o, en su defecto, haya obtenido el permiso del propietario original de la misma.

El depósito de ratones en EMMA es relativamente sencillo, pero no es automático. En primer lugar el investigador solicitante debe rellenar un documento a través de la página web de la plataforma INFRAFRONTIER (www.infrafrontier.eu) aportando todos los datos de la línea que desea archivar. Dicha solicitud será evaluada por un comité externo, independiente, que decidirá el interés, relevancia y oportunidad para que los fondos públicos que financian la iniciativa EMMA sean utilizados para congelar esta línea y ponerla a disposición de la comunidad científica. Esto quiere decir que si finalmente la solicitud de criopreservación resulta aprobada, el investigador solicitante no deberá abonar ningún gasto más allá de los necesarios para transportar los ratones desde su centro al nodo EMMA que haya sido identificado como responsable de la criopreservación de la línea, normalmente el geográficamente más cercano. Existen en la actualidad 16 nodos en Europa, integrantes de EMMA/INFRAFRONTIER, ubicados en 13 países. El CNB-CSIC es uno de ellos (ver gráfico).

Los métodos de criopreservación han evolucionado mucho desde los inicios de EMMA. En la actualidad, prácticamente todas las líneas de ratones mutantes se archivan a partir de espermatozoides congelados, usando las últimas técnicas desarrolladas por el laboratorio de Nakagata. La calidad del espermatozoides congelados se valida posteriormente con oocitos de una cepa de ratón del mismo fondo genético y, los embriones resultantes, tras la fecundación *in vitro* (FIV), también se congelan. Por lo tanto, actualmente, para congelar una línea de ratones mutantes apenas se necesitan de 3 a 5 ratones machos adultos, en edad fértil. Evidentemente, si es necesario congelar una determinada línea de ratones en homocigosis, las hembras donadoras de oocitos también deberán ser de la misma cepa.



El mantenimiento indefinido del espermatozoides y los embriones congelados se realiza en tanques de nitrógeno líquido, de forma duplicada, es decir, la mitad del material se almacena en tanques de nitrógeno líquido ubicados en otro centro, distinto del que actúa como nodo EMMA. El centro asociado al CNB-CSIC para alojar la copia de seguridad de todas las líneas de ratón congeladas es el CBMSO-UAM/CSIC, situado a unos 600 metros, en el mismo Campus de Cantoblanco.

Además de espermatozoides y embriones congelados, es posible, para determinadas líneas de ratón, criopreservar oocitos o, menos

frecuentemente, tejido ovárico, usando técnicas descritas en criobiología.

La distribución de líneas congeladas en EMMA se hace bajo demanda, también a través de la página web de INFRAFRONTIER y no es gratuita. Los investigadores solicitantes deben abonar una tarifa de reposición, necesaria para garantizar su viabilidad como archivo. Actualmente las tarifas son de 1100 € para espermatozoides congelados, y 2400 € para ratones vivos si es necesario revitalizarlos primero. Además, y en función de los requisitos del depositante, determinadas líneas de ratón pueden llevar asociado un documento MTA, que protege los derechos intelectuales e industriales de los propietarios legítimos de la línea, y que el solicitante deberá aceptar y firmar antes de poder recibirla. EMMA es un archivo distribuido en diversos nodos, de manera que las más de 4.000 líneas de ratón que EMMA mantiene congeladas están distribuidas entre los nodos participantes. Por ejemplo, el CNB mantiene aproximadamente 400 de estas líneas. En función del nodo que mantenga la línea solicitada, la aplicación web pondrá automáticamente en contacto al solicitante con el centro EMMA que se encargará de remitirle los embriones, espermatozoides o ratones vivos de la línea solicitada. En el caso de ratones vivos los animales se remiten siempre de acuerdo a las recomendaciones.

Los investigadores que depositan sus líneas de ratón en EMMA (o en cualquier otro archivo) contribuyen con ello al progreso adecuado del conocimiento científico, potencian el uso de sus resultados científicos, fomentándose las colaboraciones científicas, y ayudan a reducir el número de animales utilizados en biomedicina, evitando que otros investigadores deban generar y caracterizar, de nuevo, la misma línea de ratones mutantes. Adicionalmente, los resultados que se obtienen son fácilmente comparables con los anteriormente obtenidos con los mismos ratones por el laboratorio productor y/o por otros laboratorios usuarios.

Finalmente, con objeto de garantizar la confidencialidad de líneas de ratones mutantes que todavía no hayan sido publicadas y cuyos investigadores propietarios no deseen compartir mientras terminan su caracterización inicial y las publicaciones correspondientes, el archivo EMMA permite depositar ratones con una moratoria de publicación de hasta 2 años. Esto quiere decir que el investigador depositante tendrá la seguridad de tener sus ratones adecuadamente criopreservados tras ser remitidos a EMMA y de que estos ratones no serán públicos (no

aparecerán en la base de datos de EMMA ni en IMSR) hasta que no hayan pasado los 2 años de confidencialidad.

Conclusión

¿Por qué se deben depositar las líneas de ratones mutantes en un banco de embriones? ¿qué beneficios tiene la utilización de archivos de ratones mutantes?

- Es la mejor forma de almacenar indefinidamente cepas de ratón criopreservadas de manera segura.
- Proporciona una manera fácil de archivar y compartir, entre la comunidad científica internacional, las variantes genéticas asociadas a cepas transgénicas y mutantes generadas por los investigadores o alojadas en los animalarios.
- Permite recuperar las líneas de ratón en cualquier momento, y en particular en caso de desastres de cualquier tipo, con garantías, ya que se mantienen copias de seguridad del material criopreservado en ubicaciones físicamente distintas.
- Evita que otros investigadores deban producir una cepa equivalente, con el consiguiente ahorro de animales, tiempo y dinero.
- Aporta el valor añadido que representa poder utilizar los mismos modelos animales ya previamente utilizados por otros colegas, lo que permite validar los resultados publicados y discutir los nuevos resultados de forma científicamente correcta.
- Las líneas de ratón criopreservadas se pueden recuperar rápidamente y obtener las cepas libres de patógenos oportunistas (SOPF), si una rederivación embrionaria fuera necesaria.
- Permite eliminar cepas de ratones mutantes de los animalarios cuando éstas han dejado de usarse de forma rutinaria en la experimentación animal, con el consiguiente ahorro de animales, espacio, dinero y trabajo asociado para el mantenimiento de las mismas. Los bancos de embriones contribuyen de forma muy importante al respeto y cumplimiento de las normativas y recomendaciones de bienestar animal, a las 3Rs.
- Disminuye el tiempo y el coste para la distribución de modelos animales a otros investigadores. La distribución y difusión de nuevas líneas y de las ya existentes queda ampliamente facilitada por su disponibilidad en forma de material biológico congelado en los bancos de embriones.
- La creación de un banco con líneas genéticamente valiosas, de interés en biomedicina, facilita el intercambio internacional de las líneas de ratón, y permite disponer de una gran variedad de ellas, con un bajo coste de mantenimiento de las mismas.
- Añade valor a los modelos animales generados por los investigadores, que aparecen inscritos en las bases de datos internacionales y, por lo tanto, son accesibles, localizables, por cualquier otro investigador de cualquier lugar del mundo, favoreciéndose las colaboraciones científicas y el progreso del conocimiento.



Descongelando a Danio

Tomás García Robles y Juan Ramos Basco

Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB)

En el mundo de la investigación el pez cebra se abre paso como un nuevo competidor frente al estandarizado mundo del roedor. Por ello, se están poniendo a punto distintos protocolos que utilizan las últimas técnicas usadas con los ratones. La generación de peces cebra modificados genéticamente, que resulta mucho más sencillo que en los ratones, permite crear modelos para distintas líneas de investigación de una manera asequible para cualquier laboratorio. Esto, que es una gran ventaja, está empezando a presentar un problema debido a la gran cantidad de líneas a mantener con las complicaciones que conlleva. La criopreservación de éstas es la mejor opción, reduciendo costes de mantenimiento y facilitando el intercambio internacional de líneas.

Así pues, y copiando los buenos resultados que desde hace años se obtienen en mamíferos, se están empezando a congelar todas estas líneas para salvaguardarlas. Ya hemos visto en este mismo número de la revista las ventajas de la criopreservación, pero queremos hacer hincapié en las peculiaridades en los peces.

Aunque los peces cebra son auténticas máquinas reproductoras, los mecanismos fisiológicos implicados en este proceso no se conocen en su totalidad. Por ejemplo, hasta hace bien poco se pensaba que la determinación del sexo era de base ambiental (por la modulación de la aromatasa), pero los últimos estudios parecen indicar que esta determinación es básicamente poligenética, con distintos genes ubicados en distintos cromosomas.

El ritual del cortejo

El *Danio rerio* tiene un cortejo ritualizado que se produce al alba. La freza se produce al estimular el macho la cloaca de la hembra y ésta libera pequeñas cantidades de oocitos mientras el macho eyacula. Como todos sabemos la fecundación en esta especie es externa, lo que implica que se produce en el agua, por lo que la capacitación y activación final de los gametos, se producirá en contacto con ésta.

Para que la hembra acepte al macho, se suele decir que tiene que sobrepasar un umbral de excitación que permitirá la movilización de los oocitos y su maduración final. Este umbral de excitación es variable y se verá influido por el fotoperiodo, el aporte nutritivo y distintos enriquecimientos ambientales. Dichos oocitos permanecerán en la cavidad celómica hasta la oviposición, siendo liberados en este momento. Con la liberación y al entrar en contacto con el agua, se producirán una serie de procesos que permitirán el paso del agua al oocito mediante las acuaporinas.

A la par, el macho eyaculará sobre los oocitos para fecundarlos. Al contacto con el agua, el esperma va a sufrir una serie de cambios, mediante los que adquirirá la motilidad necesaria para poder alcanzar y fecundar el oocito. Este proceso de activación implicará una serie de movimientos de electrolitos, a través de distintos canales, debido al cambio en osmolaridad (menor en el agua) que acabará activando las mitocondrias del flagelo y dándole la motilidad necesaria.

Aunque evolutivamente los peces son más primitivos, los mecanismos básicos que permiten la fecundación de los gametos y la viabilidad son los mismos que en los mamíferos. Por tanto, existen mecanismos que permiten el reconocimiento interespecífico y evitan la poliespermia. En los peces, esto se realiza a nivel del micropilo (un agujero presente en los oocitos de los peces) que se acaba cerrando por la modificación de la membrana al entrar en contacto con el agua.

La criopreservación de esperma

La criopreservación consiste básicamente en evitar que el agua intracelular, al congelarse, forme cristales de hielo que dañen las organelas celulares. *Lo que se pretende es sustituir parte del agua intracelular, por un lado mediante un alcohol, y por otro, mediante el uso de distintos azúcares (no permeables a la membrana) que por diferencia osmótica ayudaran a extraer dicha agua de la célula.*

Estas diferencias (principalmente el tema de las acuaporinas) harán que los protocolos de criopreservación no sean extrapolables directamente desde el punto de vista murino. El alto contenido en agua de los oocitos dificulta el proceso de la criopreservación, por lo que las congelaciones de embriones en estos peces aún no son posibles. Como veremos más adelante, los embriones son especialmente sensibles en las primeras fases de desarrollo. Por ello los protocolos usados sólo permiten la congelación del esperma, y como consecuencia sólo se congelará la mitad de la información genética, aunque esto ya es un gran paso.

En nuestro caso, nos decidimos a realizar la criopreservación aplicando el protocolo de Cecilia Moens, a su vez corregido por el ZIRC (centro de referencia de *Zebrafish*), que es el que presenta mejores resultados. Este protocolo utiliza el Metanol como crioprotector, que fue descartado en ratones por su inducción a la partenogénesis.

Para realizar este protocolo se necesita poca infraestructura. Se requiere una balanza analítica para la elaboración de los medios, una lupa o esteromicroscopio, hielo seco, nitrógeno, un calentador de agua y poco más (reactivos, material de laboratorio y fungibles) nos bastarán como material de laboratorio.

Por otro lado, los gametos del pez cebra tienen una viabilidad muy corta tras la eyaculación. Debido a esto, es necesario que en la realización de este protocolo trabajen dos personas, para reducir los tiempos de manipulación de los animales y los gametos (ver Figura 1). También es fundamental finalizar los medios el mismo día de su utilización, ya que el bicarbonato pierde la capacidad tamponadora y el PH del medio puede fluctuar, por lo que los procesos de congelación no se realizarían correctamente.



Figura 1.- Trabajo en parejas.

Una vez realizadas estas consideraciones, explicaremos brevemente el protocolo que realizamos haciendo hincapié en los principales problemas que hemos observado. El proceso de criopreservación se divide básicamente en dos partes: la criopreservación (incorporaremos el crioprotector a los espermatozoides para evitar daños intracitoplasmáticos mientras lo congelamos) y la posterior descongelación de estas muestras, con las que realizaremos la fecundación *in vitro*.

Obtención y congelación del esperma

Uno de los factores más críticos son los animales con los que vamos a trabajar. Debemos disponer de animales con buena condición corporal y jóvenes (turgentes y lozanos), ya que serán los que posean los mejores gametos, siendo especialmente crítico en los machos. Así pues, hemos visto que la edad óptima es de 3 a 10 meses. Para maximizar la producción espermática, exponemos a los machos ante la presencia de hembras durante dos días, separados por una pantalla y renovando el agua, lo que mejora la concentración y producción espermática.



Figura 2.- Secado del pez.



Figura 3.- Cama de manejo.

Para secar correctamente la región de la cloaca utilizaremos un hisopo, con el macho anestesiado con Ms-222 a un plano superficial (ver Figura 2). Durante este proceso de "secado" hay que evitar dentro de lo posible quitar todo el moco y las escamas del cuerpo. La zona de la cloaca debe estar especialmente seca, ya que si está húmeda activará el esperma, por lo que habrá que desechar la muestra. Con objeto de evitar una deshidratación excesiva, cubriremos la región cefálica con un papel mojado, evitando que las branquias se deshidraten excesivamente y tapando los ojos; esto facilita el manejo (ver Figura 3). Una vez el pez está anestesiado, se realiza un masaje en sentido cráneo-caudal, desde la aleta pectoral hasta la cloaca, bajo una lupa y con unas pinzas romas (lo menos traumáticas posibles). Con ayuda de una pipeta Pasteur estirada, de mayor diámetro que las que se usan para el manejo de embriones de ratón, se recolecta el esperma (ver Figura 4). A continuación, normalizaremos el volumen a 3 μL con el medio Ginsburg SIN Metanol y lo homogenizaremos posteriormente, añadiendo en este caso el Ginsburg CON Metanol hasta los 20 μL y pipeteando 4-5 veces para finalizar nuestra mezcla. Este proceso, en el que se normaliza esperma y medios, tiene que hacerse en menos de 30 segundos para comenzar la vitrificación de la muestra, mediante la inclusión de ésta en hielo seco (-80°C). Esta vitrificación evitará la formación de cristales intra y extracelulares que dañen el esperma. Transcurrido este tiempo se procede a sumergir la muestra en nitrógeno líquido (-196°C). Tienen que respetarse escrupulosamente los tiempos ya que serán los que nos den las velocidades de congelación y de inclusión del crioprotector.



Figura 4.- Obtención del esperma.

Uno de los elementos que estamos valorando actualmente es el de establecer un método para identificar la calidad de las muestras. En las referencias bibliográficas, esta calidad se establece en base al color de la muestra (que ha de ser de un blanco opaco, como la leche entera), aunque se están considerando también otros factores, como el volumen, la motilidad y la concentración. Por ejemplo, la motilidad, que consideramos indispensable para poder completar el proceso, la

evaluamos tanto al homogenizar la muestra con los medios de congelación como al descongelarla. Para ello, colocamos la muestra bajo el microscopio, añadimos una gota de agua del sistema para activar el esperma y evaluamos a simple vista el grado de motilidad que presentan (ver Figura 5). Estos espermatozoides poseen una cabeza redonda de 4 μm , sin acrosoma, un largo flagelo y una vida muy corta tras su activación (± 1 minuto).

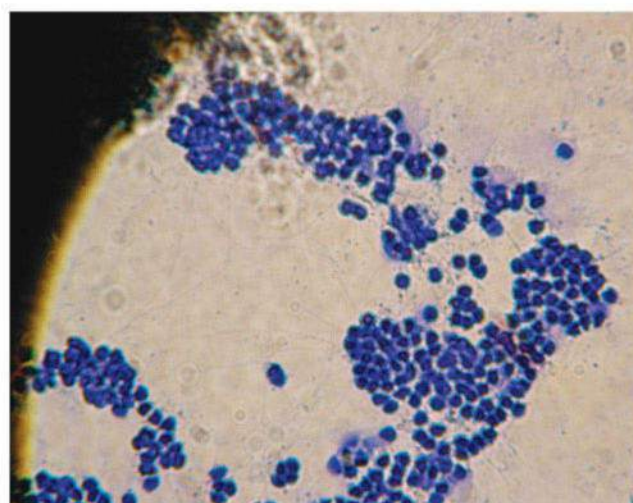


Figura 5.- Espermatozoides 100x.

De esta manera se puede conservar el esperma en nitrógeno líquido hasta el día que sea necesario revivir la línea, para lo que habrá que hacer una fecundación *in vitro*.

Descongelación y Fecundación *In vitro*

El proceso para resucitar el esperma es bastante sencillo. Básicamente consiste en la descongelación de la muestra al baño maría (33°C) para después homogenizarla con el medio de descongelación denominado Hanks. A diferencia de los machos, las hembras se expondrán a éste un solo día, e igual que en los machos, habrá que secar la cloaca para evitar la activación de los gametos. Los oocitos de buena calidad se asemejan al aspecto de un panal de abejas y con color ambarino, sin la presencia de líquido; de no ser así, los descartaremos automáticamente (ver Figura 6). Como la oviposición de los peces cebras está acotada al alba (hasta 3-4 horas después) cuanto más se aleje el momento de la extracción del amanecer, peor y más lisados nos aparecerán los huevos, lo que repercutirá negativamente en los índices de fertilización. Tras obtener una buena puesta, inmediatamente se

descongela la muestra de semen seleccionada, se mezcla con los oocitos y añadimos 750 μL de agua del sistema, que servirá para activar los gametos y que se produzca la fecundación de los mismos. Debemos mezclar (no agitar) la muestra durante 5 minutos en los que se produce la fecundación, para posteriormente completar con agua del sistema.



Figura 6.- Dos puestas, una óptima y otra mala.



Figura 7.- Primeras divisiones partenogénicas.

Una vez activados los gametos, se ve que el oocito se empieza a desarrollar. Aunque esto se produce en casi la totalidad de los huevos, hay que tener presente que estas primeras fases de división no dependen del esperma, y son partenogénicas (ver Figura 7). A las 4-6 horas se ven si hay embriones viables, que deberán separarse de los huevos degenerados para controlar adecuadamente la calidad del agua (ver Figura 8).

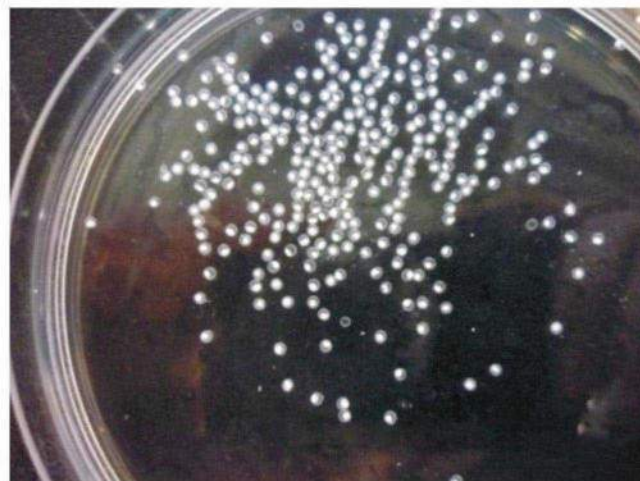


Figura 8.- Embriones viables.

Por nuestra experiencia y lo que hemos leído, la criopreservación del esperma de *Danio rerio* está en sus etapas iniciales; y existen una serie de retos y problemas que plantea el protocolo que aquí describimos, por si alguien quiere también profundizar en este apasionante mundo de la criopreservación. Los resultados son muy variables, lo que nos indica que hay procesos a los que hay que prestar más atención e intentar estandarizarlos, tanto dentro de un laboratorio como entre los distintos laboratorios que lo realizan. Aún así, es una herramienta que presenta una gran utilidad, por lo que se están formando distintos grupos de investigación que tratan de mejorar la técnica. Respecto a los resultados, la variabilidad es muy grande. En el artículo en el que nos hemos basado para la puesta a punto de este protocolo, varía entre el 0 y el 80 % de fertilidad. Esta variabilidad también la hemos encontrado en nuestras revitalizaciones.

Los últimos esfuerzos en la criopreservación van dirigidos a la congelación de las células primordiales, que son más resistentes a los procesos de congelación que los huevos y que contienen además la totalidad de la línea. Estos ensayos se están realizando antes de la gastrulación, ya que los blastómeros son más resistentes (hasta 25 células). Asimismo, el descubrimiento de unas proteínas con propiedades anticongelantes que están presentes en ciertas especies subárticas, abre una nueva ventana para la congelación de los embriones.

Ovariectomía en ratonas de laboratorio

Erica López

Centre d'Exploration Fonctionnelle Scientifique (CEFOS), Universidad de Aix-Marsella

Introducción

La ovariectomía es un procedimiento quirúrgico por el que se realiza la ablación o extirpación de los ovarios, en nuestro caso en ratonas de laboratorio.

Es una de las técnicas utilizadas hoy en día para conservar líneas de ratones genéticamente modificados. En algunos casos, los ovarios de la línea de interés responden muy poco a la superovulación, por lo que la criopreservación de los ovarios es preferible a la de embriones.

Además, la ovariectomía de ratonas, al eliminar la producción de estrógenos, es una técnica muy empleada para generar modelos de estudio de osteoporosis (Jee and Yao, 2001; Yue, *et al.*, 1994).

En la ratona, los ovarios están ubicados en los polos caudales de los riñones, que se adjuntan a la pared dorsal de la cavidad por el mesovario y están encerrados en una bolsa elástica transparente (ver Figura 1). El espacio periovárico está cerrado a la cavidad abdominal por la bolsa ovárica, con la excepción de un pequeño canal en dicha bolsa a través del que los vasos sanguíneos y los nervios entran y salen del hilio ovárico.

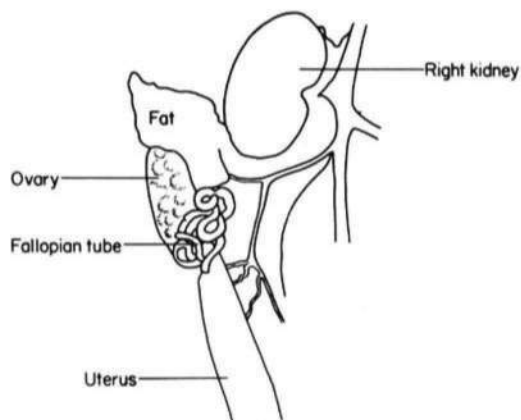


Figura 1.- Anatomía del ovario en la ratona.

La realización de la ovariectomía en ratonas, al igual que cualquier cirugía, debe realizarse bajo condiciones de asepsia quirúrgica.

Esta técnica se puede realizar en ratonas a partir de 4 semanas de edad.

Material (ver Figura 2):

Instrumental quirúrgico:

- Rasuradora.
- Unas tijeras romas 110 mm.
- Una pinza fina curva con dientes 100 mm.
- Dos pinzas rectas romas 100 mm.
- Una pinza Kocher.
- Un portaguñas.
- Hilo de sutura reabsorbible 5/0 con aguja.
- Termocauterío.
- Manta eléctrica con sonda rectal para control y monitorización de la temperatura del animal.



Figura 2.- Material quirúrgico.

Fármacos:

- Protector ocular: lubricante oftalmológico.
- Antiséptico: Povidona yodada o clorhexidina.
- Anestésicos: Isoflurano o Sevoflurano si se usa anestesia inhalatoria o bien Ketamina + xylacina si se usa anestesia inyectable.
- Analgésico: Buprenorfina 0.05-0.1 mg/kg.

Procedimiento

1. Anestesia: La mejor anestesia que permite una buena recuperación postoperatoria es la anestesia inhalatoria (ver Figura 3): sevoflurano (al 8% en inducción y 3-4% en mantenimiento) o isoflurano (al 5% en inducción y 2-3% en mantenimiento) precedida de la administración de un analgésico por vía subcutánea: buprenorfina a la dosis de 0.1 mg/kg, 30 minutos antes de la cirugía.



Figura 3.- Aparato de anestesia inhalatoria para sevoflurano.

Si no se dispone del equipamiento necesario para la anestesia inhalatoria, también se puede usar un protocolo de anestesia inyectable: 90 mg/kg de ketamina + 10 mg/kg de xylacina por vía intraperitoneal.

En este caso la analgesia postoperatoria se hará al final del procedimiento, buprenorfina a la dosis de 0.05 mg/kg por vía subcutánea.

2. Preparación del animal (ver Figura 4):

- Rasurar y desinfectar (con clorhexidina o povidona yodada) la zona de incisión del animal. Aplicar el protector ocular sobre

los dos ojos del animal.

- Colocar la ratona sobre la manta eléctrica en decúbito ventral, con la cola hacia el operador.
- Introducir la sonda rectal (para monitorización de la temperatura del animal) delicadamente en el recto del animal.

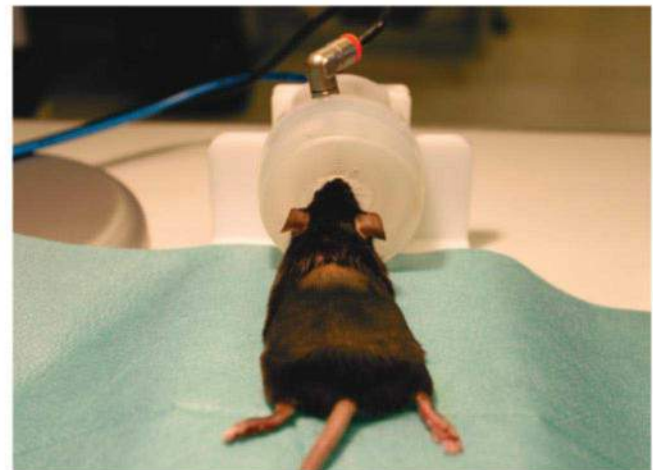


Figura 4.- Ratona rasurada colocada con el hocico en la mascarilla de anestesia inhalatoria con la cola hacia el operador.

3. Cirugía:

- Realizar una única incisión cutánea en medio de la masa lumbar y medio centímetro por detrás de las dos últimas costillas (ver Figura 5).

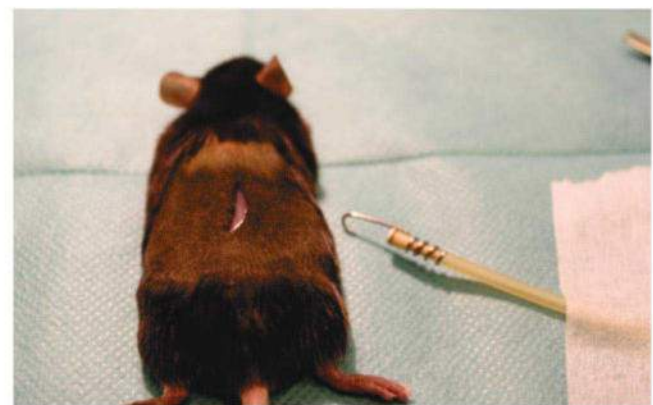


Figura 5.- Incisión cutánea en medio de la masa lumbar.

- Después, practicar la incisión del plan muscular izquierdo medio centímetro por debajo de la masa muscular (ver Figura 6).

Técnicas



Figura 6.- Colocación de un separador para desplazar la incisión cutánea hacia el lado izquierdo del animal y poder proceder a la incisión muscular que permite el acceso a la cavidad abdominal y concretamente al ovario izquierdo.

- Con las dos pinzas rectas buscar y exteriorizar el ovario tirando de la grasa blanca que lo rodea (ver Figura 7).



Figura 7.- Ovario exteriorizado y colocación del clamp entre el ovario y el cuerno uterino.

- A continuación, extirpar el ovario y la sección que lo rodea. La hemostasia se hace con el termocauterío (ver Figura 8).

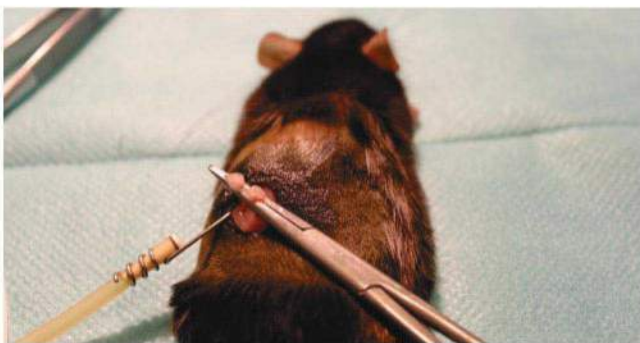


Figura 8.- Ovario ya extirpado con ayuda del termocauterío.

- Volver a colocar el cuerno uterino en su lugar y suturar el plano muscular (ver Figura 9).



Figura 9.- Sutura del plano muscular del lado izquierdo.

- Repetir la operación en el lado derecho (ver Figuras 10 y 11).



Figura 10.- Colocación del separador para desplazar la incisión cutánea hacia el lado derecho del animal y poder proceder a la incisión muscular que permite el acceso a la cavidad abdominal y concretamente al ovario derecho.



Figura 11.- Ovario derecho exteriorizado y colocación del clamp entre el ovario y el cuerno uterino.

- Cerrar la incisión cutánea con 3-4 puntos de sutura y aplicar el antiséptico (ver Figura 12). Para los más experimentados es posible hacer una pequeña sutura continua subcuticular (intradérmica) con sutura reabsorbible de 6/0 (ver Figura 13).



Figura 12.- Sutura de la incisión cutánea con puntos sueltos.



Figura 13.- Ejemplo de una pequeña sutura continua subcuticular (intradérmica) con sutura reabsorbible de 6/0 en otra ratona.

4. Cuidados postoperatorios: Tras este procedimiento los animales se pueden estabular juntos en la misma cubeta. Es aconsejable además, administrar una segunda dosis de buprenorfina (0.1 mg/kg por vía subcutánea) el día siguiente del procedimiento.

Agradecimientos

El presente artículo se ha realizado gracias a la ayuda de mis colaboradores Brigitte Billon y Thierry Cheyrol.

Nota del autor

De manera excepcional y para que las diferentes etapas del procedimiento se vean claras, las fotos se han realizado sin colocar los paños de campo necesarios para cualquier cirugía aséptica.

BIBLIOGRAFÍA

- Jee W.S. and Yao W. *Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis.* J Musculoskel Neuron Interact. 2001, 1(3):193-207.
- Yue W., Zhou D., Chen S., and Brodie A. *A New Nude Mouse Model for Postmenopausal Breast Cancer Using MCF-7 Cells Transfected with the Human Aromatase Gene.* Cancer Research 1994, 54(19):5092-5.
- Agca Y. *Cryopreservation of Oocyte and Ovarian Tissue.* ILAR J. 2000, 41(4):207-20. doi:10.1093/ilar.41.4.207

Páginas web de consulta

- <http://www.procedureswithcare.org.uk/aseptic-technique-in-rodent-surgery/>
- <http://www.jove.com/video/2586/principles-of-rodent-surgery-for-the-new-surgeon>



Foto: shutterstock

Lechos Premium para
Animales de Laboratorio



LIGNOCEL®



Eficacia, fiabilidad y
trazabilidad aseguradas.



Calidad superior certificada acorde
ISO, HACCP, PEFC y EnMS

Travesera de Gracia 56, 2º2ª
08006 Barcelona
Tel. 933 262 888
e-mail: info@jrsiberica.com

RETENMAIER IBÉRICA
S.L. Y CIA. S. COM.



Fibras diseñadas
por la naturaleza
Una compañía del grupo IRS

Refinando la extracción de esperma en ratón: El muestreo epididimario *in vivo*

Gonzalo Moreno Del Val y Patricia Muñoz Robledano

Instituto de Neurociencias de Alicante CSIC-UMH

Introducción

La gestión de colonias de ratones transgénicos es en muchas circunstancias bastante compleja. Las propias características de algunas cepas transgénicas, pero sobre todo las malas decisiones y los errores humanos provocan, en no pocas ocasiones, que las líneas se encuentren en una situación en la que sea muy factible su pérdida por un fallo en la reproducción, quedando normalmente sólo 1 o 2 machos de edad avanzada. La forma más habitual de intentar rescatar estas líneas es la fecundación *in vitro* (FIV), pero el problema es que la muestra espermática suele extraerse *postmortem* y si sucede algún imprevisto en esta técnica tan sensible, ya no hay marcha atrás.

Por ello, pensamos en una solución para aumentar el número de experimentos de FIV a realizar y por tanto, las posibilidades de éxito en el rescate de la línea. Técnicas como la electroeyaculación, la eyaculación mediada por fármacos y los cruces dirigidos para obtener el esperma del útero nos ofrecían la posibilidad de obtener muestras seriadas *in vivo*, pero con una serie de inconvenientes que podían presentar varios problemas, como una elevada mortalidad y un éxito variable tanto en el caso de la electroeyaculación como en el de la eyaculación por fármacos. La necesidad de un protocolo de hormonación, cruce y posterior observación del tapón vaginal es a veces complicado y por supuesto, también lo es la imposibilidad de poder ajustar el muestreo a los estrictos horarios de la técnica de FIV (cruces dirigidos). En todas ellas, la muestra procede de esperma eyaculado y no se puede usar directamente, por lo que es preciso centrifugarla para quitar la orina y las secreciones de las glándulas accesorias (aunque en ocasiones puede ser complicado retirar la porción coaguladora). Además, después de todo este procedimiento, la viabilidad ($51.9\% \pm 18.1$ frente a $46.2\% \pm 5.8$) y la motilidad ($60\% \pm 5.8$ frente a $43.3\% \pm 3.3$) del esperma epididimario son mucho mayores que las del esperma eyaculado (Songsasen and Leibo, 1998).

En ese momento es cuando surgió la idea de hacer una aproximación a la técnica de reproducción asistida humana de biopsia testicular, aunque el objetivo era realizarla sobre el epidídimo, ya que allí se encuentran los espermatozoides de mayor calidad.

Para poder validar la técnica, planificamos un experimento con 6 machos C57BL/6J de 12 semanas de edad en los que se realizó la extracción espermática del epidídimo izquierdo y la vasectomía del lado derecho. La muestra extraída se utilizaba en FIV para determinar su utilidad, mientras que los machos operados se dejaban reposar durante 10 días, y a continuación se cruzaban con dos hembras C57BL/6J de 2 a 3 meses de edad hasta obtener una camada. Este experimento se repitió en los mismos machos para comprobar la posibilidad de realizar extracciones seriadas.

El resultado fue que todos los machos sobrevivieron y permanecieron fértiles, obteniendo camadas dentro del primer mes después de sus cruces naturales. Pudo obtenerse además una muestra espermática de todos ellos, con la que se consiguió una tasa de fertilización media del 56.7%, sin que hubiese una diferencia significativa en los porcentajes obtenidos con el esperma del primer muestreo y el segundo.

Material necesario:

- Pinzas de relojero nº 5.
- Pinzas romas finas o de anillo.
- Tijeras de disección y microdisección (vannas).
- Pinza hemostática serra-fina.
- Pipeta bucal.
- Capilar de cristal de 0.58 mm de diámetro interno.
- Aguja hipodérmica de 32 G.

Procedimiento

1. Anestesia y analgesia: La anestesia que aporta un mayor grado de seguridad es la inhalatoria. En nuestro caso, al no disponer del equipamiento necesario, realizamos un protocolo de anestesia inyectable Ketamina/Dexmedetomidina, para lo que empleamos 0.38 ml de Imalgene 1000® y 0.5 ml de Dexdomitor®, completamos el volumen con 4.12 ml de suero fisiológico estéril y administramos esta mezcla al ratón a razón de 10 µl/g por vía intraperitoneal.

Como analgésico prequirúrgico utilizamos Meloxicam 2 µl/g por vía subcutánea.

2. Preparación del animal:

Una vez administrada la anestesia y la analgesia, aplicamos Viscotears® como lubricante oftalmológico y colocamos al animal en posición decúbito dorsal encima de una placa calefactada para evitar pérdida de temperatura durante el procedimiento.

A continuación, rasuramos y desinfectamos con povidona yodada el área escrotal para comenzar la cirugía (ver Figura 1).

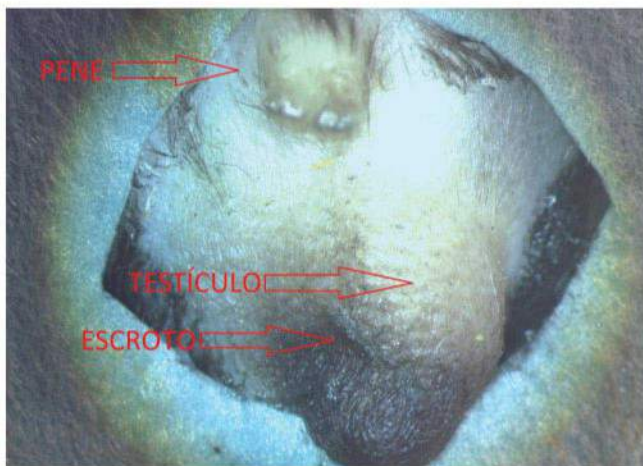


Figura 1.- Área quirúrgica preparada.

3. Procedimiento:

Acceso escrotal

Para aislar la cola de uno de los epidídimos se accede al paquete testicular con la misma rutina que para la vasectomía del ratón (ver Figuras 2, 3 y 4). Una vez localizado el paquete testicular,

se exterioriza cuidadosamente (hay que ser muy meticulosos a la hora de manipular estas estructuras) pinzando en una región de grasa que se encuentra entre el polo caudal del testículo y la cola del epidídimo; de esta manera evitamos lesionar cualquier estructura reproductiva.



Figura 2.- Incisión escrotal.



Figura 3.- Cola del epidídimo a través de la capa muscular.

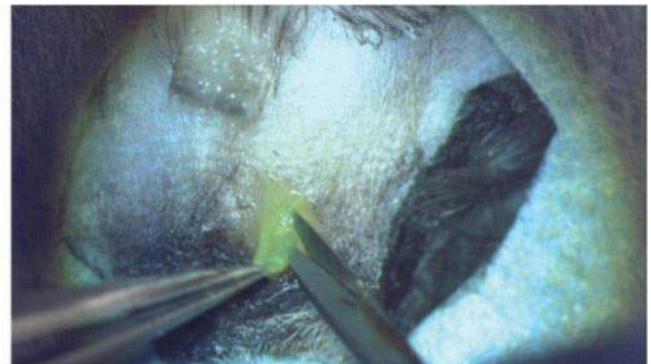


Figura 4.- Apertura de la capa muscular.

A continuación, traccionamos esta grasa hasta exteriorizar la cola del epidídimo (ver Figura 5) y tratamos de aislarla de los tejidos adyacentes para facilitar la punción y evitar que al tomar la muestra espermática con el capilar, otros fluidos corporales puedan ensuciarla.

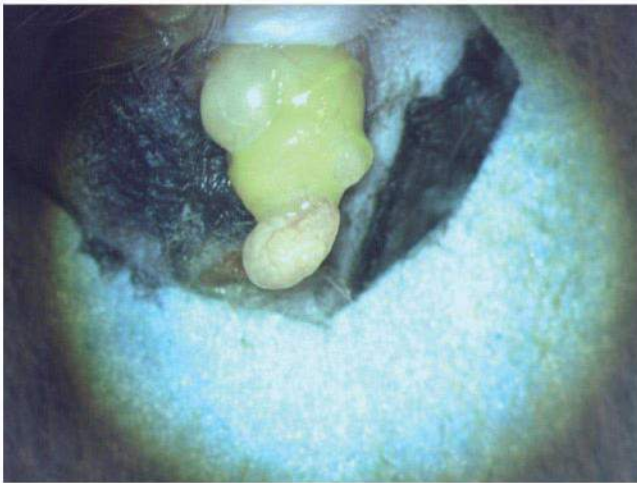


Figura 5.- Epidídimo fuera de la capa muscular.

Posicionamiento

Posicionamos la cola del epidídimo de manera que al realizar la punción la muestra pueda reposar en la superficie de esta estructura sin resbalar por la misma, y para ello lo mejor es que quede situada totalmente paralela a la superficie plana en la que se apoya el ratón. Cuando la posición sea la idónea, la fijaremos pinzando la región de grasa adyacente con una pinza hemostática serra-fina.

Muestreo

Preparamos una pipeta bucal con un capilar de 0.58 mm de diámetro interno para recoger la muestra y una aguja hipodérmica de 32 G ya dispuesta para realizar la punción.

A continuación, situamos el ratón en la lupa y visualizamos la cola del epidídimo para buscar un punto idóneo para realizar la punción, que debe reunir las siguientes características:

- Estar alejado de la vascularización superficial epididimaria.
- Estar situado en una zona de la cola del epidídimo con la menor pendiente posible, para así evitar que el esperma se derrame.

Una vez tenemos todo dispuesto, fijamos la cola del epidídimo con mucho cuidado con la ayuda de unas pinzas de punta roma, y con la otra mano realizamos la punción con la aguja hipodérmica en el punto seleccionado con anterioridad (ver Figura 6).

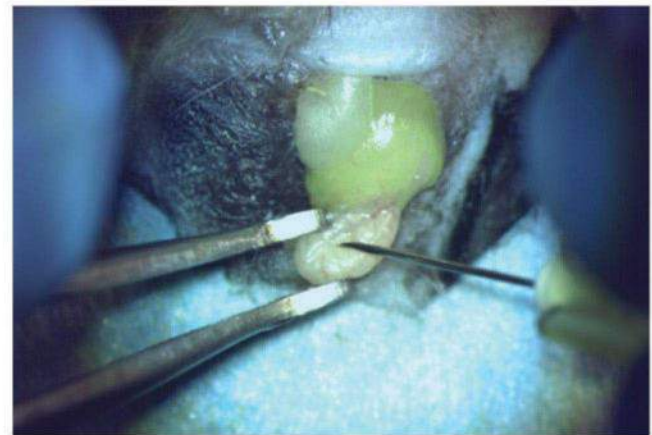


Figura 6.- Punción epididimaria.

Sacamos la aguja con rapidez, e inmediatamente después de retirarla comenzará a surgir una gota de esperma epididimario puro, debido a la presión con que se encontraba empaquetado en el interior (ver Figura 7).



Figura 7.- Flujo espermático tras la punción.

Esperamos unos segundos mientras se va formando la gota, y posteriormente hacemos contactar el capilar que teníamos preparado en la pipeta bucal ejerciendo una leve succión, y evitando contactar cualquier otro líquido (ver Figura 8). De esta manera podemos recoger aproximadamente 1 µl de esperma epididimario puro.

Esta muestra podrá ser utilizada directa e inmediatamente para su estudio, o en experimentos de mutagénesis, etc., pudiendo incluso transportar el capilar que contiene la muestra.

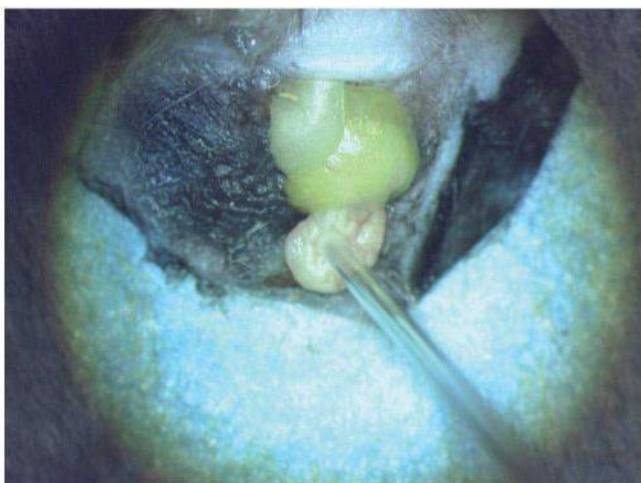


Figura 8.- Recogida de la muestra.

4. Finalización:

Hidratamos la cola del epidídimo con suero fisiológico estéril antes de reintroducirla en el cuerpo.

Suturamos por capas las incisiones realizadas.

Colocamos al animal en una fuente de calor hasta que se despierte y se mueva de manera activa, momento en el que lo alojaremos en una jaula individual con agua previamente tratada con paracetamol y comida.

Aplicaciones

El muestreo *in vivo* epididimario surgió para poder realizar rescates de líneas cercanas a la desaparición, aunque la mejora en las técnicas de criopreservación espermática ofrecen nuevas posibilidades para este tipo de situaciones. Posteriormente comenzamos a utilizarla para rederivar líneas mediante FIV, con la ventaja de que en la barrera sólo es necesario introducir el capilar que contiene la muestra. En la actualidad, la técnica está siendo utilizada por diversos grupos de investigación en el campo de la genética y la reproducción, y por distintos servicios de transgénesis, como herramienta para evaluar mosaicismos en ratones fundadores o la contribución a la línea germinal de las quimeras.

Agradecimientos

Nos gustaría agradecer el constante apoyo y trabajo de nuestros compañeros del Servicio de Experimentación Animal de la UMH, y en especial de nuestros colegas del Animalario RMG del Instituto de Neurociencias de Alicante CSIC-UMH.

BIBLIOGRAFÍA

- Del Val G.M. and Robledano P.M. *In vivo serial sampling of epididymal sperm in mice*. Lab Anim. 2013, 47(3):168-74. doi: 10.1177/0023677213478411.
- Anderson R.A. Jr., Oswald C., Willis B.R., and Zaneveld L.J. *Relationship between semen characteristics and fertility in electroejaculated mice*. J Reprod Fertil. 1983, 68(1):1-7.
- Loewe S. *A pharmacological ejaculation test for bioassay of male sex hormone*. Proc Soc Exp Biol Med. 1937, 37:483-6.
- Songsasen N. and Leibo S.P. *Live mice from cryopreserved embryos derived in vitro with cryopreserved ejaculated spermatozoa*. Lab Anim Sci. 1998, 48(3):275-81.





Dietas
Lechos y Virutas
Jaulas y Racks
Sistemas acuáticos

Equipos
Enriquecimiento
Distribución
Soporte técnico

Animales de Experimentación: nueva regulación de los requisitos de capacitación del personal encargado de su manejo

Salvador Fortes Alba

Por fin ha visto la luz la esperada Orden Ministerial sobre formación. Os presentamos un artículo sobre la misma que ha escrito Salvador Fortes Alba.

Aunque algunos ya lo conoceréis por su participación en la última jornada Científica de SECAL, Salvador Fortes es Licenciado en Derecho, Funcionario de la Escala de Técnicos Superiores de Organismos Públicos de Investigación y Vocal Asesor de la Dirección General de Investigación Científica y Técnica (Secretaría de Estado de Investigación Científica y Técnica), que ha sido el órgano proponente de la Orden Ministerial.

Ha formado parte del grupo de trabajo que ha redactado la Orden Ministerial. Desde esta 'posición de privilegio', nos comenta los aspectos fundamentales de la misma. Espero que os sirva de apoyo para entenderla y aplicarla.

Jesús Martínez Palacio

El pasado día 1 de abril se publicó en Boletín Oficial del Estado la Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Contexto y propósito de la orden

Esta orden cumple con el mandato de desarrollar los requisitos de formación del personal que trabaja con animales de experimentación contenido en el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. El propio Real Decreto contiene en su artículo 15 los principios generales que han de regir esta materia y que son ahora objeto de desarrollo.

De esta forma, contamos por primera vez en nuestro ordenamiento jurídico con una regulación completa y sistemática de una materia tan directamente relacionada con el bienestar del animal de experimentación, como es la formación y competencia del personal encargado de su manejo.

No obstante, la orden ministerial es respetuosa con las competencias de las comunidades autónomas de forma que, sin renunciar a su cometido fundamental de establecer una regulación armónica que facilite el movimiento del personal en todo el territorio nacional, permite un amplio margen de desarrollo por ellas. No hay que olvidar que son las propias comunidades autónomas quienes tienen la competencia para la aplicación de la norma y por tanto para emitir las autorizaciones y reconocimientos que en ella se regulan.

Además, como es obligado, la orden ministerial cumple con las reglas que sobre la materia ha dictado la Unión Europea, que actualmente están contenidas en la Directiva 2010/63/UE, del Parlamento Europeo y el Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. Asimismo, con objeto de facilitar la movilidad del personal a nivel comunitario, la orden ministerial ha recogido plenamente las directrices que ha dictado recientemente la Comisión Europea.

La orden ministerial parte del principio de que el personal que pretenda trabajar con animales de experimentación deberá estar adecuadamente capacitado con carácter previo a realizar el trabajo de manera autónoma.

Además, la capacitación, una vez alcanzada, requiere de un acto administrativo (reconocimiento) por el que la autoridad competente, después de comprobar que se cumplen los requisitos establecidos, emite una certificación que equivale a la autorización para poder realizar la función de que se trate en todo el territorio nacional.

Una novedad importante en esta orden es que el reconocimiento de la capacitación no es indefinido, sino que obliga al personal a convalidarlo al menos cada ocho años, para lo cual debe preocuparse por realizar actividades de formación continua. Con esto se pretende garantizar la mejora y puesta al día de las habilidades y conocimientos inicialmente adquiridos. La orden convierte esta cuestión en una obligación no sólo para el personal, sino también para los establecimientos en los que prestan servicios.

Requisitos de la capacitación

No es posible dar una respuesta global a la pregunta de cuáles son los requisitos de capacitación, porque tales requisitos difieren en cada una de las funciones en que se divide el trabajo con animales de experimentación.

Sin embargo, es posible indicar, con carácter general, que hay tres pilares fundamentales en los que se basa la capacitación en la orden ministerial, que son:

1. La posesión de determinadas titulaciones académicas.
2. La realización de cursos específicos de formación.
3. La superación de un periodo de trabajo bajo supervisión.

Respecto del primer pilar, las titulaciones académicas, la orden sólo las exige para las funciones de diseño de los proyectos y procedimientos, supervisión "in situ" del bienestar animal y veterinario designado. En los dos primeros casos es precisa una titulación superior en Biología (animal), Medicina, Veterinaria o cualquier otra disciplina que incorpore en su programa formativo estudios sobre biología y fisiología animal, mientras que para el veterinario designado es preciso tener una titulación superior que permita el ejercicio de la veterinaria.

Sin embargo, para las funciones de cuidado de los animales, eutanasia de los animales y realización de los procedimientos, la orden considera suficiente (aunque no obligatorio) estar en posesión de una titulación de formación profesional o certificado de profesionalidad que recoja el contenido formativo de esas funciones. Se pretende dar la importancia debida a la formación profesional y ocupacional, reconociendo el valor de capacitación profesional que llevan aparejadas. Todo ello siendo conscientes de que en el momento actual los módulos formativos correspondientes distan de estar adecuadamente desarrollados.

Por lo que se refiere al segundo pilar, los cursos específicos de formación, la orden ministerial contiene una regulación muy completa y exhaustiva.

Todas las funciones requieren la superación de cursos de formación. Estos cursos deben estar dirigidos a la impartición de determinados módulos formativos temáticos orientados a la consecución de unos resultados de aprendizaje que garanticen el manejo de los animales en condiciones de competencia. El anexo I de la orden contiene los módulos de cada función y los resultados de aprendizaje asociados. Los módulos se clasifican en troncales (comunes a todas las funciones y especies) y de función (específicos de una o más funciones y especie o grupo de especies).

Para garantizar la seguridad jurídica, los cursos que sirvan al propósito de la capacitación del personal deben estar reconocidos por la autoridad competente, de forma que los diplomas que se expidan tras su superación tengan validez para dicha capacitación en todo el territorio nacional. Con este fin, la orden ministerial regula de forma muy detallada los requisitos de los cursos y de las entidades que los imparten y contiene por primera vez reglas específicas aplicables a los cursos no presenciales.

Dentro de la regulación de los cursos, la orden ministerial ha querido dar entidad propia a las condiciones en que han de utilizarse animales vivos con fines formativos, de forma que se garantice la estricta aplicación del principio de las "tres erres".

El trabajo bajo supervisión es el tercer pilar del proceso de capacitación y se aplica a las funciones de cuidado, eutanasia y realización de procedimientos sobre los animales. Esta figura es novedosa en nuestro sistema y supone que el personal que cumpla los demás requisitos establecidos en la orden ministerial, antes de poder trabajar de forma autónoma deberá superar un periodo de trabajo bajo la estricta supervisión de un experto en un establecimiento. El establecimiento debe expedir, una vez que compruebe la competencia en la función de que se trate, un certificado que, finalmente, servirá para la expedición del reconocimiento de la capacitación.

Personal capacitado por la normativa anterior

La orden ministerial, dando cumplimiento al Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, reconoce plenamente las

capacitaciones obtenidas conforme a la normativa anterior y establece un sistema de equivalencias entre las categorías de aquella normativa y las funciones de la actual.

El personal afectado podrá, por tanto, seguir realizando sus funciones sin necesidad de reconocimiento alguno. No obstante, en aras de la seguridad jurídica, la orden obliga a las comunidades autónomas a mantener un registro de tales capacitaciones de forma que el personal afectado pueda obtener en cualquier momento un asiento registral o una certificación de la función o funciones de la actual normativa para las que está capacitado.



PRINCIPIOS ÉTICOS EN INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA CON MODELOS ANIMALES

9

NORMATIVA BÁSICA ACTUAL:
REAL DECRETO 53/2013,
SOBRE LAS NORMAS BÁSICAS
APLICABLES
PARA LA PROTECCIÓN DE
LOS ANIMALES UTILIZADOS
EN EXPERIMENTACIÓN
Y OTROS FINES CIENTÍFICOS.



Diseño de animalarios. Principios básicos

Juan Martín-Caballero, DVM, PhD

Director del animalario PCB-PRBB Animal Facility Alliance, Barcelona

Cuando me propusieron escribir un breve artículo sobre el diseño de animalarios, existiendo libros y tratados completos dedicados a este complejo asunto, y habiendo participado en veintisiete diseños de animalarios de diferentes instituciones y empresas, tanto nacionales como internacionales, pensé que a lo más que podía aspirar en estas páginas, basándome en mi experiencia de más de treinta dos años, es a dar unas líneas generales de cuáles son los principios básicos que hay que tener presentes para diseñar un animalario.

Desde luego si me preguntaran sobre la ubicación idónea, lo tengo muy claro, edificio independiente con toda la distribución en la planta de abajo y la planta técnica arriba. Cuando se ha sufrido la gestión diaria de un animalario en una planta superior con la logística de montacargas y ascensores, no se olvida nunca. Y qué decir de la complejidad o inviabilidad de los sistemas de emergencia y evacuación de personas y animales en tales ubicaciones superiores.

Qué modelos animales alojará el animalario (roedores, cerdos, acuáticos...) y de qué categoría sanitaria (convencionales, SPF, SOPF o axénicos) determinarán muy claramente los niveles de barreras que tendremos que diseñar e instalar, desde la calidad del aire a los niveles de desinfección y esterilización de todas las mercancías.

De manera general, y antes de entrar en aspectos concretos, es preciso señalar que el tipo de investigación que se vaya a realizar con esos modelos animales también influirá en el diseño de los laboratorios, los niveles de biocontención y el tamaño de las salas.

Ni que decir tiene que el equipamiento seleccionado para los animales, el equipamiento científico y el equipamiento pesado del área de lavado y esterilización, nos condicionará el tamaño de puertas, superficies de las salas y alturas necesarias.

Es imprescindible tener esta información señalada en los puntos anteriores, para poder abordar un primer esquema o diseño conceptual.

Cuando se han gestionado varios y diferentes animalarios además de diseñarlos, se tienen muy claras las diferentes zonas de la instalación y el flujo de animales, mercancías y personas. Éste quizás haya sido el error más frecuente que he podido detectar en diseños de animalario realizados por personas que nunca han gestionado alguno.

Las principales áreas de un animalario siguen un proceso lógico y funcional (ver Figuras 1 y 2). Entrada de animales y cuarentenas. Entrada de mercancías y almacenes. Accesos de personas y vestuarios. Materiales a limpiar, desinfectar y esterilizar, zona de lavado y esterilización. Manejo de los animales y laboratorios. Retirada de residuos y cadáveres.

Obviamente, estas diferentes áreas están interconectadas a través de sistemas o equipos (esclusas o SAS), que separan zonas de diferentes estatus sanitarios de manera microbiológica, sellando desde el suelo al techo de manera hermética.

El tamaño de las salas debe de tener la superficie necesaria para las funciones que se vayan a realizar, no sólo el espacio que ocupan los animales. Hay que pensar también en los carros o contenedores de materiales estériles, cabinas de flujo laminar, contenedores para retirar el material sucio, y movimientos adecuados de las personas. Separar las zonas de cría y de experimentación es fundamental para evitar contaminaciones cruzadas y el estrés en los animales en producción. Las paredes y suelos fácilmente desinfectables, sin materiales porosos o ranuras, y poco ruidosos, que amortigüen vibraciones y ruidos. Los acabados de suelos y paredes en media caña, evitando siempre los ángulos rectos, ya que se acumula la suciedad en esos sitios difíciles de limpiar. Protección de paredes en pasillos mediante tubos o pantallas que evitan el impacto de carros y racks sobre ellas. Pasillos de suficiente anchura para el tránsito de los racks y contenedores. Sistemas de comunicación con el exterior, en pasillos y laboratorios, red de voz y datos en todos ellos para facilitar el envío de información sin necesidad de estar pasando papeles de una zona a otra.

estandarizan todos los procesos de sanitización. Reduciendo con ello el personal de animalario dedicado a estas labores y empleando más personal a tareas de cuidado y manejo de los animales. Los mayores y más delicados puntos de intercomunicación de las diferentes zonas confluyen en esta área, ya que en ella se reciben todos los materiales sucios y desde ella se distribuyen los elementos ya esterilizados. A través de autoclaves de doble puerta, SAS o esclusas. Estos equipos junto con las duchas de aire en vestuarios conforman la auténtica barrera.

El bienestar humano debe de estar contemplado también desde el principio en el diseño de los animalarios, con sistemas de aspiración de virutas sucias y automatismos de lavado, con vestuarios espaciosos y bien dotados, dimensionados para el número real de personas que pueden confluir en él. Hacer un buen diseño de los vestuarios ayuda considerablemente a mantener la higiene y el control de la barrera. La ducha de aire versus ducha de agua ofrece multitud de ventajas cuando se trata de controlar los accesos a las zonas de barrera. Si proyectamos un animalario de nivel de seguridad biológica P-3, los criterios de descontaminación son más estrictos y los circuitos de entrada y salida de las personas deben de ser distintos para evitar posibles contactos.

Las salas de administración del animalario con una amplia red de voz y datos por todo el animalario facilita la gestión de los miles de datos que se generan en el día a día de estas instalaciones. Una sala de reuniones para el personal del animalario es imprescindible para organizar el trabajo, hacer formaciones específicas y favorecer la convivencia.

Almacenes bien situados cerca de la entrada de mercancías y contiguos al área de lavado y esterilización, favoreciendo con ello el flujo de material y el control de mercancías.

Los planes de evacuación de personas y animales se deben de contemplar obligatoriamente en el diseño del animalario, haciendo posible la realización de simulacros sin que ello suponga la ruptura de barrera, mediante sistemas de esclusas bien dimensionadas, presiones diferenciales mantenidas y con puertas enclavadas. Con sistemas de alarma que por su longitud de onda no alteren a los animales y sean audibles por los humanos.

Soy consciente que surgirán algunas dudas, y que faltan muchos matices por concretar en cada uno de los apartados

mencionados, pues cada uno de ellos sería objeto como mínimo de un capítulo monográfico; se trata en este artículo de exponer principios generales sobre el diseño de animalarios.

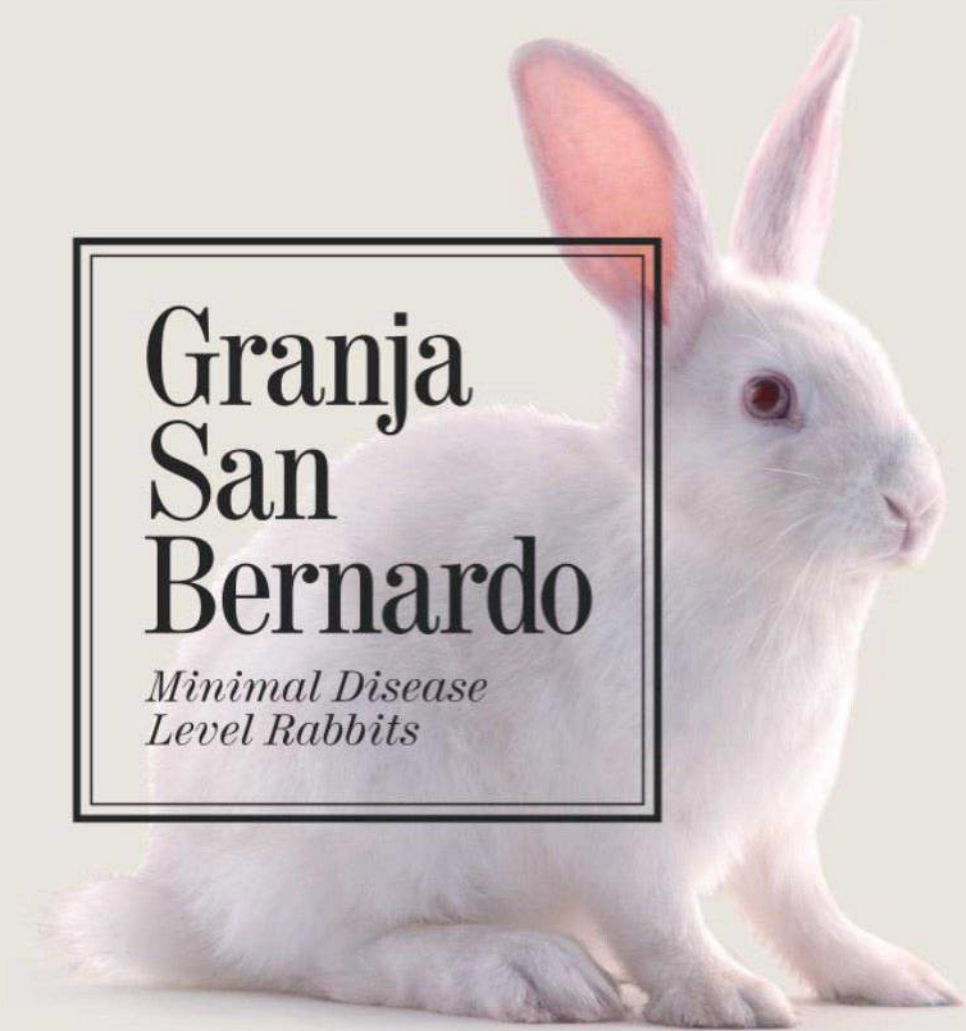
BIBLIOGRAFÍA

- Hessler J.R. and Lehner D.M. *Planning and Designing Research Animal Facilities*. American College of Laboratory Animal Medicine 2009.
- NIH Design Policy and Guidelines.
<http://orf.od.nih.gov/PoliciesAndGuidelines/BiomedicalandAnimalResearchFacilitiesDesignPoliciesandGuidelines/Pages/DesignRequirementsManualPDF.aspx>.
- Canadian Council on Animal Care.
<http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Facilities.pdf>.

**TÚ TAMBIÉN
PUEDES SER
PARTE DE
LA SECAL
¡HAZTE SOCIO!**

www.secal.es





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.granjasanbernardo.com

Incertidumbre e innovación

Javier Fidalgo

Socio-director en Ocelata consultores

Parece ser que a los seres humanos nos molesta la incertidumbre. Necesitamos dar un sentido a todas nuestras experiencias. Y rápido.

En situaciones o experiencias nuevas tenemos mucha más urgencia en dar un sentido, cualquiera, que acertar dándoselo. Por ejemplo, antes de convertirlos en un fenómeno meteorológico, esa apremiante necesidad interpretó los rayos como un recurso de algunos dioses.

Esta incomodidad con la incertidumbre parece impulsarnos a creer que vivimos en un mundo estable compuesto por acontecimientos predecibles. Reducir la sensación de incertidumbre no sólo es deseable sino parece ser una condición para sobrevivir. Sin embargo, eliminarla es imposible pues es inherente a la existencia: vivir implica morir. ¿Cabe más incertidumbre que saber que un día moriremos pero no saber cuándo ni cómo sucederá? Aceptemos de cualquier modo que esto es incómodo.

En mi caso, que me encanta viajar a lugares culturalmente muy distintos al mío, la víspera del viaje mezclo las ganas por dejar "el mundo conocido" con un incómodo desasosiego. Atribuyo éste a una construcción fantasiosa de mi parte emocional que imagina, sin mi permiso, lo que será abandonar mi estado normal de acontecimientos predecibles y controlados por otro distinto en el que desconozco lo que pueda ocurrir. Claro está, como ya he dicho, que la situación inicial no es tan segura como tiendo a imaginar, ni la nueva tan imprevisible como exagera mi inconsciente. Si me dejase llevar por la urgencia de acabar con el desasosiego me perdería todo el enriquecimiento personal que obtengo en cada viaje.

Voy a intentar llevar estas ideas a un terreno algo más abstracto partiendo de una proposición:

Una idea nueva nace a partir de un espacio mental individual de incertidumbre.

Es porque dudamos de la validez de una idea o grupo de ellas que generamos otra que la sustituya. Existe un momento, entre el nacimiento de la nueva y la invalidez de la antigua, en el que "no sabemos". Es un espacio de incertidumbre.

La incertidumbre es por tanto un requisito para mejorar algo. Si una organización desea que quienes trabajan en ella traten de mejorar cómo se hacen las cosas, necesitará que cada uno abra espacios de incertidumbre que permitan la emergencia de nuevas ideas que alimenten formas alternativas, y mejoradas, de hacer las cosas.

Todo lo anterior es lo racionalmente deseable. Sin embargo, lo que nos suele ocurrir es que enfrentados a una sensación de desasosiego, nuestra prioridad absoluta es tratar de reducirla. Y lo hacemos sin saber que lo estamos haciendo de forma rápida e inconscientemente.

Esa incomodidad aumenta si la necesidad objetiva de dar una respuesta es mayor. Ciertos problemas demandan que se priorice la urgencia de la solución sobre su calidad. Por ejemplo, si estoy pescando en el mar a bordo de una barca y se abre una vía de agua en el casco, un trapo que tape la vía me servirá, ¡ya tendré tiempo de reparar el casco en tierra firme!

En cambio, hay otro tipo de problemas en los que la solución no es evidente y su calidad es muy relevante (¡aunque en entornos organizacionales la urgencia siempre esté presente!). En este caso se necesita mantener durante un tiempo un espacio de incertidumbre que permita emerger suficiente número de opciones diferentes que posibiliten construir la solución más adecuada según el caso. En entornos organizacionales, a la presión autoimpuesta para encontrar la solución procedente, repito, de nuestro desasosiego con la incertidumbre, se suele sumar la del entorno que exige soluciones rápidas. Como se puede imaginar, en estos casos será aún más difícil mantener ese espacio de incertidumbre y se necesitará controlar con más ahínco las ganas de ofrecer una respuesta.

Factor Humano

El manejo del espacio de *incertidumbre* como requisito metodológico

De esta tensión, *urgencia por dar una solución - necesidad de no darla*, son bien conscientes quienes utilizan una metodología llamada *design thinking (DT)*.

El *DT* es una metodología de innovación que se está expandiendo como una nueva forma de definir una estrategia empresarial, resolver un problema o diseñar lo que sea: un juguete, un proceso de venta, una investigación, una casa, una forma de enseñanza... cualquier cosa que pretenda ser innovada. La empresa Procter & Gamble, por ejemplo, lo empezó a utilizar hace algunos años para volver a *centrarse en el cliente* (1).

En esencia, el *DT* es una forma de encontrar una solución novedosa a una necesidad humana centrándose en las personas. En tanto el poder de esa metodología es hallar soluciones novedosas, cuidar de que el *espacio de incertidumbre* no sea resuelto precipitadamente forma parte esencial de su éxito. ¡De otro modo las soluciones ya no serán tan sorprendentes!

Para quienes usan el *DT*, su éxito está íntimamente asociado a la defensa del espacio de *incertidumbre*, ¡y la angustia asociada a esa defensa también!

Eric Folger (2), un experimentado diseñador que usa *DT*, explicaba en una entrevista el viaje emocional que suponía cada nuevo proyecto. Folger es tan consciente de la necesidad de reconocer, para gobernar, la ansiedad asociada a *ese espacio de incertidumbre* que creó un gráfico mostrando dos variables: duración del proyecto y grado de ansiedad en su equipo, él incluido (ver Figura 1). En los peores momentos, decía Folger, *tengo que estar recordándome que tengo la habilidad para resolver el problema aunque todavía no tenga la solución. Esta angustia es lo esperable, es donde debo estar. A pesar de haber hecho muchos proyectos exitosos, sigo pasando por el mismo proceso de angustia.*

Es decir, Folger ya sabe que debe reconocer esa angustia, considerarla inherente al *espacio de incertidumbre* y que sentirla es lo apropiado.

De vuelta a lo cotidiano

Cada vez más organizaciones demandan a quienes trabajan en ellas que contribuyan a mejorar los procesos, procedimientos,

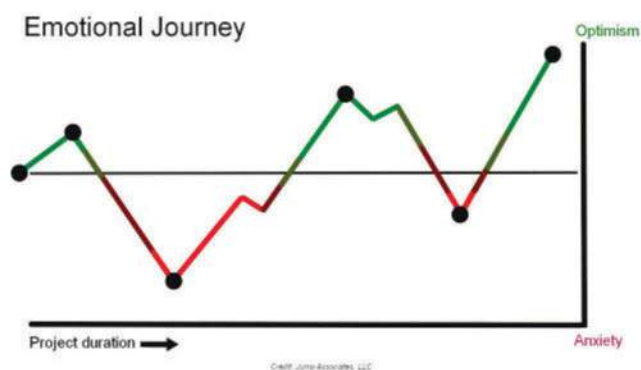


Figura 1.- Gráfico de incertidumbre.

formas de cooperar, etc. en los que participan. Esta actividad de mejora, antes opcional y practicada por algunas pocas organizaciones, se está convirtiendo en una necesidad para todas.

Ya hemos visto los elementos que parecen concurrir para que surjan ideas que generen innovación, ya sean estas grandes ideas usando el *DT* como otras, quizás más modestas, que mejoren nuestra forma de trabajar. Debemos primero ser conscientes de nuestra incomodidad en la incertidumbre y luego gobernarla (la incomodidad). Necesitamos sentir y aceptar como normal la incomodidad de "no saber" para desactivar el mecanismo automático de dar una "respuesta" priorizando la rapidez sobre su calidad.

A mi entender, esas organizaciones sinceramente interesadas en que sus trabajadores mejoren, innovando, su entorno y actividad, deberían considerar el ayudar a las personas a desarrollar su habilidad para generar y manejar espacios de incertidumbre controlada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cohan P. (3 de diciembre 2012). How Procter & Gamble Designs Change. Recuperado de: <http://www.forbes.com/sites/petercohan/2012/03/12/how-procter-gamble-designs-change/>
2. Ver: <http://ericfolger.com/>.

International Product Supplies Limited



Feeding the Innovations of Modern Research

- European Manufacture
- Used & Trusted in Facilities Worldwide
- Fast Flexible Lead Times
- Nutritional Expertise & Advice
- Traceability
- Quality Assurance
- Prompt Delivery
- Modern Technology

TestDiet® Europe

- DIO High Fat Range
- Fenbendazole
- Doxycycline
- Helicobacter
- AIN Series
- Tamoxifen

www.testdiet.com



LabDiet

- All Species
- Meal
- Autoclavable
- Irradiated
- Extruded
- GLP

www.labdiet.com



Also available to order
in Spain and Portugal
from IPS distributor:

Sodispan Research S.L.

C/ Isla de Tavira, 14
28035 Madrid, Spain
Phone: +34 629159613
Facsimile: +34 914593962
Email: sodispan@sodispan.com

Puntos críticos en el cambio de cubetas

Paloma García Potrero

Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)

En este número voy a hablaros de los puntos críticos en el cambio de cubetas del animalario del CNIO. Como anécdota, voy a contaros que tengo compañeros que han trabajado en otros animalarios y dicen que en el animalario del CNIO se trabaja mucho, debido al gran número de cubetas, pero que es muy interesante trabajar en él por las diferentes patologías que podemos apreciar.

Para aquellos que no lo sepan, el cambio de cubetas consiste normalmente en pasar al ratón de la cubeta sucia a la cubeta limpia, sustituir el biberón usado por uno limpio y cerciorarse de que el comedero tiene suficiente pienso para toda la semana. Aparte de esto, hay que estar pendiente de las patologías de cada ratón y del cambio de rejilla y cobertor. Todo esto lo explicaré más detalladamente a continuación.

Las personas involucradas en el cambio de cubetas son tres:

- **Supervisores de animalario:** personas encargadas de proporcionar a los cuidadores material suficiente para el desarrollo del cambio, realizar los pedidos de dicho material y organizar el *planning* semanal y/o diario del personal que va a desarrollar el cambio de cubetas.
- **Cuidadores:** personas que manejamos el material, tal y como cuento más adelante, y estamos pendientes de las patologías de los ratones y de su evolución y que, llegados a un punto, tendremos que avisar al técnico.
- **Técnicos:** personas que tienen la última palabra sobre el estado de los animales y que avisan al usuario.

En el CNIO, cada pareja de cuidadores tiene asignado un número de salas que se cambian diariamente, una sala cada día de la semana. Por ello, cada mañana, lo primero que hacemos es mirar el *planning* del día, en el que se nos indica qué sala toca

cambiar, y revisar las demás salas. Los cuidadores debemos saber cuántas cubetas hay en cada sala, para lo que disponemos de un archivo en el ordenador, que actualizamos mensualmente, en el que consta el número y tipo de cubetas de cada sala.

Una jaula para alojar ratones está compuesta por (ver Figura 1):

- **Cubeta:** disponemos de 4 tipos de cubetas que, dependiendo de su superficie y del peso de los animales, nos permiten alojar un determinado número de ratones. Las cubetas están fabricadas de macrolón y polisulfuro materiales que, entre otras ventajas, presentan una gran transparencia y una buena resistencia a los impactos y a las temperaturas elevadas.
- **Viruta de chopo:** las cubetas se rellenan automáticamente de viruta de chopo en el área de lavado cada vez que se sacan para limpiar.
- **Enriquecimiento ambiental** (también conocido como juguetes): necesario para la estimulación física y psicológica de los animales; p. ej.: rulos, filtros de algodón que se deshacen como nidos, "bisbales" (comúnmente llamados en el CNIO) que son tiras de cartón cortadas en laminitas que los ratones utilizan como nido...
- **Rejilla:** estructura de acero inoxidable necesaria para la contención de los animales dentro de la cubeta, y en la que se deposita el alimento y la bebida de éstos.
- **Biberón:** disponemos de distintos tipos de biberones dependiendo del tamaño de la cubeta y del número de ratones.
- **Cobertor:** elemento que se coloca encima de la cubeta y contiene un filtro para evitar el contacto del ambiente de fuera con el interior de la cubeta.
- **Tarjetero:** contiene la tarjeta (ver Figura 2) con toda la información necesaria de los ratones que hay en la jaula: nombre y descripción de la línea, número de ratones, sexo, fecha de nacimiento... También puede contener otro tipo de tarjetas como las pato-identificadoras, que son tarjetas pequeñas pero llamativas en las que se indica que algún ratón de la cubeta tiene una o varias patologías, las tarjetas de tratamiento de bebida, tratamiento de comida, procedimiento, etc.

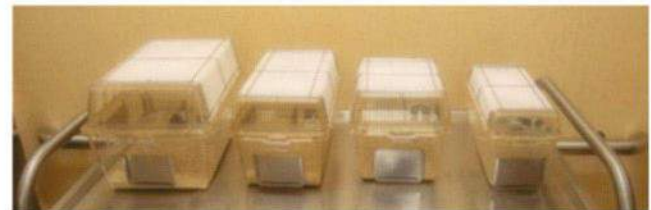


Figura 1.- Jaulas completas de alojamiento de ratones.

The figure shows three types of identification cards used for mouse management:

- REPRODUCTION:** A card with fields for Strain ID, Cabin, Date of labor, Strain, Genotype, ID, DOB, N. & Series, Generation, User, Procedure, Cross N., Form, to, ID male, N. pups, Plug, Pregnant, Mating Type, Out date, and OOR.
- P. Breed:** A card with fields for Strain ID, User, Cabin, P. Breed, Strain, Genotype/sex, ID female, DOB, Tag & Series, ID male, DOB, Generation, a table with columns for DOB, N., Pregnant, Wean, Kill, and Comments, Start, Finish, Out date, and OOR.
- STOCK:** A card with fields for Strain ID, Serie, User, Cabin, STOCK, Strain, Treatment, Sex (Yes/No), Tag, Mouse ID, DOB, Genotype, Parents, Out date, and OOR.

Figura 2.- Tarjetas

Una vez conocemos el *planning* diario y el número de cubetas, tenemos que preparar todo el material necesario para el cambio: cubetas, rejillas, cobertores, sacos de pienso, material de oficina (tarjetas con la información de los ratones, bolígrafos, pato-

Al cuidado

identificadores, hoja de incidencias...), etc. Una vez tenemos todo el material necesario preparado, empezamos a cambiar las cubetas.

Cogemos la primera cubeta del primer rack (estantería de acero inoxidable con ruedas en la que se sitúan las cubetas) y la llevamos a la campana de flujo laminar, nos desinfectamos las manos con desinfectante, cogemos el tarjetero para ver el sexo y número de animales que hay en la cubeta y lo ponemos en la cubeta limpia, abrimos la rejilla y cobertor y cogemos con cuidado los ratones, uno a uno, por la base de la cola, observándolos detenidamente y comprobando que coincida con la información de la tarjeta. Si detectamos cualquier patología en el ratón, la apuntamos en la hoja de incidencias para dar parte al técnico y que valore la situación del animal y añadimos al tarjetero un pato-identificador para que sea más fácil su localización y nos ayude a estar más pendientes del animal. Una vez tenemos los ratones en la cubeta limpia, ponemos el enriquecimiento ambiental, ponemos la rejilla, colocamos un biberón limpio y, si hiciera falta, rellenamos el comedero para que no les falte pienso en toda la semana.

Si se nos ha indicado que en ese rack también hay que cambiar rejilla y cobertor, además de la cubeta, también los ponemos limpios. La rejilla y el cobertor se cambian cada 6 semanas, las salas tienen entre 4 y 8 racks por lo que, normalmente, en todas las salas siempre hay un rack de rejilla y cobertor que cambiar. Una vez que tenemos la cubeta limpia con los ratones dentro, la volvemos a dejar en su mismo sitio, cogemos la siguiente y así, con todas las cubetas de la sala.

Una vez hemos terminado de cambiar todas las cubetas, recogemos el material sucio y lo depositamos en carros, colocamos las cubetas y los biberones según su tamaño, sacamos el material al área de lavado para su limpieza, y una vez limpio, pasan por las autoclaves.

Desmontamos y limpiamos con desinfectante la campana de flujo laminar, así como todas las superficies utilizadas de la sala. Vaciamos las papeleras y desinfectamos también el suelo. Por último, pasamos el parte de incidencias al técnico.

Espero queridos lectores, haberos entretenidos una vez más y que os haya parecido interesante este artículo.



Foto: shutterstock

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
EBECO + EHRET FUSION



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

Seguridad en el manejo de nitrógeno líquido (LN2)

Jesús Martínez Palacio y Carmen García Ortiz
Técnicos Superiores en Prevención de Riesgos Laborales

En un monográfico como el actual, no podemos dejar pasar la oportunidad de revisar los principales riesgos asociados al manejo de líquidos criogénicos (fundamentalmente el nitrógeno líquido LN2), su prevención y la actuación en caso de accidentes.

Riesgos asociados al manejo de Ln2

Podemos definir seis riesgos asociados a las diferentes características y efectos de este gas:

1. Quemaduras

EL LN2 tiene una temperatura de -196°C . Esta temperatura provoca quemaduras por frío por tres vías:

- *Contacto directo*: Especialmente peligroso en el caso de los ojos (humedad de la córnea y conjuntiva - ver Figura 1). También es peligroso el uso de dobladillos en pantalones o guantes tipo cirujano, que pueden prolongar el tiempo de contacto por retención del LN2 en su interior y agravar la quemadura (ver Figura 2).



Figura 1.- Quemaduras por salpicaduras de LN2 en un antebrazo descubierto. ¿Imagináis el efecto sobre un ojo?



Figura 2.- Atención a los dobladillos de los pantalones y agujeros en zapatos/sandalias.

- *Materiales en contacto con el LN2*: Especialmente metales por su capacidad de transmitir la temperatura (ver Figura 3).

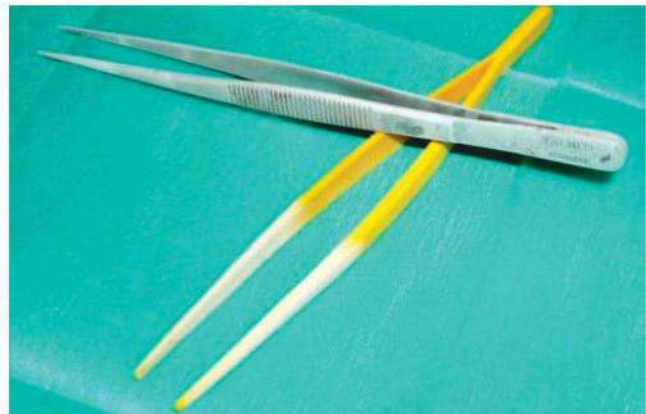


Figura 3.- Mucho cuidado con los elementos metálicos en contacto con LN2.

- *Respiración de vapores fríos de LN2*: La llamada niebla criogénica, se forma al evaporarse el LN2 en una atmósfera con humedad. Tiene dos problemas, el asociado a su

respiración (por frío) y la posibilidad de reducir la visión en locales cerrados (lo comentaremos en el rescate de accidentados).

2. Asfixia

El nitrógeno forma parte del aire que respiramos (78%), no es tóxico y se caracteriza por ser inodoro e incoloro (no podemos detectarlo). El N₂ es menos denso que el aire (0.97 frente a 1 del aire), pero los vapores de LN₂, por su temperatura y la formación de nieblas criogénicas, tienden a acumularse en las zonas bajas de las salas.

Un litro de LN₂ genera 695 litros de gas a 21°C y 1 atm de presión (condición normal de laboratorio), por lo que el riesgo de asfixia se asocia al desplazamiento del oxígeno respirable.

El aire normal contiene un 21% de O₂, y concentraciones inferiores al 18% pueden ser letales (ver Figura 4).



Figura 4.- Riesgos en función de la concentración de oxígeno.

Hay una correlación peligrosa entre el volumen de LN₂ y la superficie de la sala, estableciéndose que un litro de LN₂ puede contaminar unos 2.5 m² de superficie. Lógicamente esto depende de las condiciones de ventilación de la sala.

La inconsciencia que induce la falta de oxígeno es rápida, se pierde la movilidad y la capacidad de actuación. La víctima es incapaz de reaccionar.

Estos problemas pueden deberse a:

- Derrames accidentales de LN₂ (o derrames excesivos por un mal uso).
- Pérdida de vacío en el aislamiento de los tanques contenedores (que lleva a la evaporación total del contenido).
- Fallos en los sistemas de llenado automático de los tanques.

3. Fragilización de materiales

Muchos materiales (material biológico, gomas, plásticos y algunos metales) se fragilizan en contacto con el LN₂. Esta fragilización puede inducir su rotura generando riesgos de:

- Proyección de fragmentos de material.
- Roturas de los suelos de vinilo, atención a tropezones y caídas (ver Figura 5).



Figura 5.- Fragmentación y levantado de un suelo vinílico por efecto del LN₂.

4. Proyección de materiales

El LN₂ es un gas a presión, su índice de expansión es de 1:695 (la pólvora varía de 1:200 a 1:2000). Cuando el líquido pasa a gas genera una enorme presión.

Hay que tener especial cuidado con la proyección/disparo de tapas o tapones en recipientes que puedan contener LN₂ (ver Figura 6). Por ejemplo: tapas de color en tubos Eppendorf (siempre con apertura) o bolas de cierre de pajuelas de criopreservación.



Figura 6.- Usad siempre tapones con ranura para evitar el acúmulo de presión en los criotubos.

5. Incendio

El LN2, al circular por tubos puede inducir la condensación de O₂ sobre los mismos aumentando el riesgo de incendio (el oxígeno condensa a partir de -183°C).

6. Biocontaminación

La legislación referente a bancos de tejidos humanos considera que el LN2 puede ser un medio de transmisión de patógenos.

Medidas de prevención y equipos de protección personal

Se tratan de manera conjunta para cada tipo de riesgo.

1. Quemaduras

La principal recomendación es ser consciente del riesgo y actuar con la debida prudencia. Existen equipos de protección individual que serán obligatorios utilizar al trabajar con LN2 (ver Figuras 7 y 8):

- Guantes criogénicos, en buen estado y que sean fáciles de quitar.
- Protección facial/gafas de seguridad, incluso si se usan gafas graduadas.
- Mandiles de protección, ya que el diseño de los equipos hace que en muchas ocasiones la niebla criogénica contacte en el abdomen del manipulador.



Figura 7.- Equipos de protección individual obligatorios para trabajar con LN2.

En caso de derrames, hay que tener mucho cuidado con la posible acumulación de líquido en repisas, cajones... Y atención a las asas de los recipientes, si las bañamos con LN2 o niebla criogénica.



Figura 8.- Equipos de protección individual (EPIs).

2. Asfixia

La correcta ventilación de las salas en las que se manipula o almacena LN2 y la vigilancia de los niveles de O₂ son obligatorias en el caso de grandes volúmenes de nitrógeno o en locales pequeños y zonas con difícil ventilación.

Los medidores de oxígeno (ver Figura 9) suelen colocarse a 170 cm del suelo (altura de la persona estándar en que se encuentran las vías respiratorias), pero si en la instalación trabajan personas de menor altura, debe considerarse instalarlos más bajos. Generalmente están tarados de modo que cuando se llega a un nivel del 19% se active la ventilación; y si se llega al 18%, se bloquea el acceso y se activa una alarma sonora y visual.



Figura 9.- Oximetría en sala.

La ventilación de estas salas suele hacerse por extracción a nivel del suelo (retirar el N₂ - ver Figura 10). Generalmente los sistemas funcionan automáticamente por tiempo y se activan ligados a los sensores de oxígeno.



Figura 10.- Extracción a nivel del suelo.

En estos casos hay unas normas básicas de comportamiento que siempre debemos seguir:

- NUNCA entrar si las alarmas están activadas.
- Activar la ventilación al entrar en la sala.
- Comprobar que el nivel de oxígeno está por encima del 19%, esperar hasta que el valor se recupere hasta un 20% mínimo.
- Mantener las puertas abiertas mientras se trabaja en estas salas (ver Figura 11).



Figura 11.- Mantenga las puertas abiertas mientras se trabaja.

- No trabajar solo, siempre debe haber alguien vigilando (otra persona fuera o mediante cámaras de circuito cerrado).

3. Fragilización de materiales

Usar bandejas resistentes para proteger los suelos, y actuar con precaución para evitar derrames (ver Figura 12).



Figura 12.- Bandeja para protección del suelo.

Actuación en caso de accidentes

Siempre debe observarse la conducta **PAS**:

P – Proteger

A – Avisar

S – Socorrer

Evitar que otras personas se accidenten, avisar a los equipos de emergencia y socorrer (con el principio de las 3S – Sólo Si Sabes).

1. Contacto con los ojos:

- Lavar con agua tibia de manera inmediata y manteniendo el ojo abierto.
- Debe lavarse durante 10-15 minutos.
- Siempre consultar a un médico, aunque parezca no haber daños.

2. Quemaduras en piel

- Tratar como cualquier quemadura.
- No retirar la ropa, los cristales de hielo pegan la tela y la piel.
- No frotar ni cepillar las partes congeladas.
- Calentar el área afectada progresivamente. Poner en contacto con otra parte del cuerpo (caliente) o mojar con agua a no más de 40°C.
- Produce un dolor muy intenso.
- Consultar al médico

3. Asfixia

- Llevar la persona a un lugar ventilado y sin contaminación.
- Dejarla descansar y mantenerla caliente.
- Si la respiración es dificultosa o se para, aplicar ventilación mecánica, se puede añadir O₂.
- Si el accidentado está en parada cardiaca, personal entrenado puede iniciar la reanimación cardiopulmonar.

NUNCA ENTRAR A SOCORRER A UN ACCIDENTADO SIN USAR EQUIPOS DE RESPIRACIÓN AUTÓNOMOS (ver Figura 13). Esta acción ha causado muertes en trabajadores.



Figura 13.- Equipos de respiración autónomos.

4. Derrame accidental

- Evacuar al personal a un lugar seguro.
- Ventilar la zona y monitorizar el nivel de oxígeno.
- Cuidado con la niebla criogénica, puede reducir la visión en el área.
- Nunca entrar a la zona (salvo con respiración autónoma) salvo que se haya comprobado que la atmósfera es segura.
- Cerrar todas las válvulas para evitar mayores derrames.

La prevención de riesgos laborales es responsabilidad de todos. Actuar de manera segura y respetar los protocolos de seguridad puede, en este caso, salvarnos la vida.



Foto: shutterstock

La criopreservación marca el camino para el control de la salud genética y microbiológica de nuestros modelos murinos

M^a Carmen Muñoz, PhD

Cryopreservation Service-IRB, Parc Científic de Barcelona

Desde que en el año 1982 apareciera la primera publicación sobre animales modificados genéticamente, se ha estimulado muchísimo el intercambio de ratones entre las diferentes instituciones y laboratorios, algunos con estándares de salud poco consistentes. Mientras que la presencia de ciertos organismos puede ser o es tolerada por una institución, el impacto en los estudios de otra puede exigir sólo animales "limpios". Así las cosas, es muy importante y conveniente establecer un buen programa de vigilancia de la salud veterinaria y una lista de los organismos que deben ser excluidos del animalario. Sobre todo, para aquellos centros que dispongan de una zona libre de patógenos - *Specific Pathogen Free (SPF)* -, esta lista debería ser imprescindible para lograr una buena gestión de sus instalaciones y el mantenimiento de las normas institucionales.

En muchos animalarios, la recepción de los animales procedentes de casas comerciales versus los importados desde instituciones externas recibe diferentes niveles de atención. Un acceso directo de los animales a sus instalaciones cuando éstos provienen de reconocidos proveedores con un elevado estatus sanitario mantenido durante años, y uno indirecto para aquellos que provienen de laboratorios de investigación (con un bajo o desconocido estatus sanitario).

Por otro lado, hay instituciones con múltiples áreas de estabulación y trabajo, cada una con un estatus sanitario diferente. En estos centros, se ha de establecer un patrón de seguimiento y entrenamiento del personal que entra en los diferentes niveles sanitarios que hay en cada zona (p.ej., sucia, convencional y SPF). Este entrenamiento y conocimiento es crucial para mantener la integridad del estatus sanitario deseado.

La rederivación es el método más seguro y el elegido por la mayoría de los laboratorios para "limpiar" o descontaminar a los ratones de ciertos patógenos, así como de ciertas enfermedades

de transmisión zoonótica, antes de introducirlos en sus instalaciones de barrera o SFP. De esta manera conseguimos proteger, primero, a las colonias que ya tenemos de un posible brote infeccioso, y segundo, a los investigadores, que podrían malinterpretar los resultados de sus estudios. La rederivación, también protege al personal e investigadores de un raro pero posible caso de recibir animales transportadores de una zoonosis transmisible.

La contaminación de los animales de laboratorio puede darse por dos vías: por transmisión horizontal o por transmisión vertical. La transmisión horizontal se da por contacto directo o indirecto (fómite) con el animal infectado. La mayoría de estos contaminantes transmitidos horizontalmente - como los ácaros, endoparásitos, bacterias, micoplasmas y muchos virus - son eliminados en el proceso de la rederiva. Los virus que se transmiten verticalmente son aquellos que lo hacen a través de los gametos o son transferidos a través de la placenta. Algunos de estos virus presentan un riesgo para la salud humana, como por ejemplo el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV).

En sus inicios, la rederivación consistía en una histerectomía (cesárea). Actualmente, la técnica utilizada es la transferencia embrionaria. Y esto es debido a que ha quedado claramente demostrado que los embriones en su estado pre-implantacional (desde el estadio de 1 célula hasta el de blastocisto) tienen menos posibilidades de ser contaminados que las crías obtenidas mediante cesárea. La clave está en la zona pelúcida del embrión, que lo protege de infecciones. Así, los patógenos que se adhieren al embrión son lavados tratando la zona pelúcida con hialuronidasa seguido de múltiples lavados en medio de cultivo. Después se transfieren los embriones al oviducto de una "madre de alquiler" o madre subrogada. Los embriones preimplantacionales flotan en el lumen del oviducto sin tener mucho contacto con el útero de la madre hasta que se implantan. Sin embargo, las crías obtenidas por cesárea han estado conectadas a través de la placenta y han compartido los fluidos corporales de la madre por más tiempo.

Control Sanitario

En multitud de artículos científicos ha quedado completamente demostrado que la rederivación por transferencia embrionaria puede eliminar los siguientes patógenos: parvovirus murino (MPV), virus de la hepatitis murina (MHV), minute virus mice (MPV), diarrea epizootica de ratones lactantes debida a un rotavirus (EDIM), virus de encefalomiелitis murina (GD-VII), adenovirus, *Helicobacter* spp., endoparásitos y ectoparásitos. Y bacterias como la *Pasteurella pneumotropica* que en cambio, no se elimina en la rederivación por cesárea.

La rederiva por transferencia embrionaria - y según las recomendaciones de FELASA, el OIE (Código Zoosanitario Internacional) y de la IETS (*International Embryo Transfer Society*) - consiste en el "método de lavado en 10 etapas". Cabe destacar que este código, que regula el intercambio internacional de embriones y gametos, establece este método aceptado para la no-transmisión de enfermedades. Brevemente, consiste en el paso sucesivo de los embriones con la zona pelúcida intacta y libres de materiales adheridos por alícuotas de medio, pudiéndose asociar a tratamientos con tripsina y antibióticos. Los procedimientos se llevan a cabo de manera aséptica, utilizando materiales y medios estériles. Se han de realizar un mínimo de diez lavados, asegurándose el uso de un capilar nuevo estéril en cada paso y que el volumen de medio de lavado implique una dilución al menos 1:100 respecto al material introducido (embriones + medio que los acompaña).

El tiempo requerido para completar una rederiva por transferencia de embriones es de 7-8 semanas si la hacemos por Fecundación *In Vitro* (FIV), monta natural e histerectomía, o de 6-7 semanas si la hacemos a partir de embriones congelados. Se considera que la rederiva está completada cuando tenemos ratones destetados y analizados.

Criopreservación

El elevado coste de los animales modificados genéticamente ha disparado su intercambio y las colaboraciones entre la comunidad científica. Este hecho provoca que en muchos animalarios, el mayor volumen de animales que entran a sus instalaciones sean los pertenecientes al segundo grupo, los que podríamos considerar "no seguros". La mejor opción para la entrada de estas líneas a los animalarios desde el punto de vista de control sanitario sería a través de embriones y/o espermia congelado (ver Figura 1).

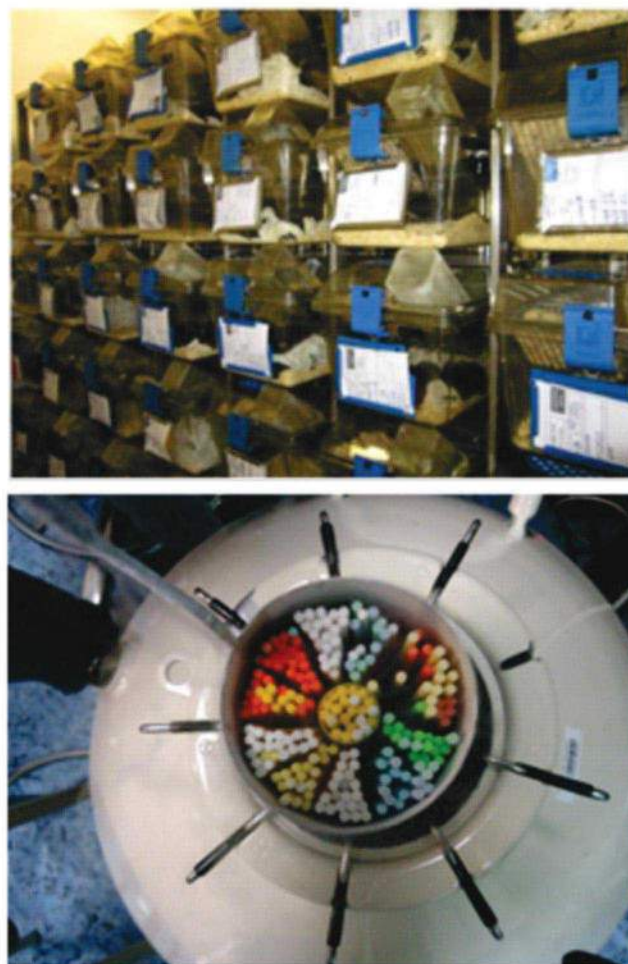


Figura 1.- A) Animales modificados genéticamente "no seguros". B) Tanque de nitrógeno líquido con embriones y/o espermia congelado.

La primera congelación de embriones de ratón se realizó en el año 1972 y desde entonces, ha habido muchos avances en la criopreservación de gametos. De hecho, hoy en día ya tenemos muchas líneas murinas almacenadas en repositorios, donde los investigadores pueden obtener embriones o espermia congelados de un modelo murino específico.

Este material criopreservado facilita la rederivación de nuevas cepas en los animalarios. Los embriones son enviados desde repositorios nacionales e internacionales en nitrógeno líquido directamente al laboratorio. Allí, una vez descongelados, los embriones se lavan bien a través de diez gotas de medio. En el caso de recibir espermia congelado, la rederivación debe

realizarse con más cuidado. Aunque los oocitos provengan de hembras provenientes de un reconocido proveedor, el gameto masculino es más difícil de limpiar que el embrión. Así pues, es recomendable que después de que se generen los embriones, éstos sean lavados y transferidos a la madre subrogada, y se realice un cribado (como para cualquier rederivación), antes de trasladar las crías destetadas a su ubicación definitiva.

Cabe destacar que la mayoría de las veces en que producimos embriones para una rederivación, queda un stock de embriones adicionales que podemos criopreservar para no malgastarlos. Éstos pueden servir para una segunda rederiva en el caso que la primera no haya funcionado.

Las madres subrogadas y sus camadas deberían estabularse en una sala separada del resto de animales estabulados hasta que se determine su estado sanitario. Una rederiva bien ejecutada, realizada bajo circunstancias ideales, eliminará la mayoría de microbios no deseados, pero no debemos descartar la posibilidad de una contaminación horizontal de los embriones y la madre subrogada por fómites. Dependiendo del riesgo existente entre la cantidad de animales rederivados y un posible animal positivo del total de animales estabulados, alojaremos a los rederivados en zonas o jaulas aisladas. La opción menos deseable es estabular a los animales rederivados en jaulas aisladas compartiendo espacio con el resto de animales sanos o libres de patógenos. Pero si esto no se puede evitar, entonces debemos abrir las jaulas de los animales rederivados lo menos posible, y siempre después de manipular primero a los sanos.

La transmisión de agentes patógenos viene determinada por su estabilidad ambiental, el tipo de jaula usada y el procedimiento de manejo. La contaminación de los animales rederivados por ecto- o endoparásitos es improbable cuando sólo los embriones son llevados al laboratorio de rederiva.

De hecho, con la criopreservación de gametos (embriones y esperma) conseguimos: salvaguardar nuestras valiosas líneas de posibles infecciones, enfermedades, fallos de cría, catástrofes naturales, accidentes como inundaciones en las jaulas y la deriva genética, además de reducir los costes de mantenimiento. Pero antes de desarrollar algunos de estos puntos, hay una consideración a tener en cuenta.

Antes de criopreservar una línea, primero hemos de pensar: porqué, cuándo y cómo. Para elegir la mejor estrategia es

importante tener previamente una idea clara de los futuros requerimientos para el uso de esa línea, y así determinar cuánto esfuerzo debemos invertir en el procedimiento. La criopreservación de embriones requiere el uso de un significativo número de hembras donadoras de oocitos. Mientras que la de esperma sólo requiere de 1 o 2 machos. Ahora bien, mientras que la resucitación de una línea a partir de un stock congelado de embriones incluye la transferencia embrionaria, la resucitación a partir de esperma requiere de una técnica más complicada, la FIV. En comparación con la criopreservación de esperma, con la criopreservación de embriones ganamos mucho tiempo cuando la línea contiene más de una mutación o el transgen es mantenido en homocigosis.

Otra de las razones que podemos considerar para congelar una línea viene dada por el hecho de que normalmente una línea transgénica se produce o se retrocruza con líneas congénicas (*inbred*), lo que puede resultar en una disminución de la fertilidad tanto en machos como en hembras quizás mucho antes de lo esperado. Como consecuencia, la línea puede fácilmente perderse después de un período de inatención.

Otro argumento importante para decidirse por la criopreservación de nuestras valiosas líneas es el impacto de la deriva genética. Después de varias generaciones dentro de una colonia cerrada, es posible acumular pequeños cambios genéticos, que pueden modular el fenotipo de la línea original. Este riesgo aumenta cuando la mutación es mantenida en un fondo genético mixto. Además, también pueden aparecer mutaciones espontáneas que también influenciaran en las características del modelo. Basado en los dos puntos anteriormente mencionados, como regla general, sólo tendremos "activas" aquellas líneas que están en constante demanda o serán usadas en los próximos 12 meses. En cualquier otra circunstancia, la mejor opción es algún tipo de criopreservación.

Por otro lado, tenemos el problema del espacio. El crecimiento exponencial de las líneas mutantes murinas está forzando al mantenimiento de estas líneas dentro de los laboratorios que las crearon, y, como consecuencia, al animalario que respalda al laboratorio. Esto supone un gran coste difícil de soportar, así como una pérdida de espacio disponible dentro de los animalarios. Y esto, de rebote, puede retrasar la realización de nuevos protocolos experimentales.

Control Sanitario

El coste de criopreservación de una línea es mucho más bajo que el mantenimiento de una línea viva. Aunque el mantenimiento de las muestras tenga un coste continuado anual.

Otra gran ventaja de la disposición de un sistema de almacenaje de las diferentes líneas murinas en nitrógeno líquido dentro de un animalario es el rápido intercambio que se puede dar entre diferentes laboratorios y centros de investigación alrededor del mundo, evitando problemas relacionados con el estatus sanitario y de resultados, abaratando muchísimo el procedimiento.

Y por último, destacar que con la criopreservación cumpliremos más fácilmente la legislación vigente en materia de bienestar animal, en particular el concepto de las 3Rs: refinamiento, reemplazo y reducción de la investigación con animales, siempre y cuando sea posible.

Por lo tanto, y para resumir, diremos que con la criopreservación de EMBRIONES: conseguimos preservar todo el genoma, de modo que al descongelar y transferir los embriones a una madre subrogada, rescataremos exactamente la línea que congelamos inicialmente.

La criopreservación de esperma requerirá técnicas de fertilización *in vitro*, y los ratones revividos podrían no ser genéticamente iguales a los individuos utilizados para la criopreservación, ya que sólo hemos conseguido criopreservar la mitad del genoma (haploidía).

La criopreservación de embriones y esperma, no sólo es el método de elección para el almacenamiento de modelos mutantes murinos al final de una investigación, sino también es válido para crear una copia de seguridad durante su desarrollo.

Finalmente, concluiremos diciendo que con la criopreservación de las líneas murinas en relación al control sanitario de un animalario obtendremos más pros que contras. La ventaja más destacable es que, al no entrar animales vivos directamente, evitamos contaminar el animalario por resultados analíticos falsos negativos o no detectados previamente, además de no requerir de una zona de cuarentena para la estabulación de animales contaminados. Mientras que entre las desventajas destacaremos que pueden aparecer problemas en la gestión de la reproducción; es necesario personal especializado, sobre todo si partimos de esperma congelado, para realizar la técnica; no hay esperma o

embriones congelados de todas las líneas, y quizás el punto más importante es que el investigador ha de planificar bien y con el tiempo suficiente el estudio teniendo en cuenta los tiempos hasta llegar a la cantidad de animales y la edad deseada (esto no ocurre en un transporte directo de animales vivos).

Si todos los animalarios que necesitaran trabajar con animales no comerciales dispusieran de un laboratorio de criopreservación, y se extendiera la rutina de criopreservar todas las líneas, podría llegar a ser una realidad que el intercambio de modelos murinos se realizara a través de sus embriones o células germinales, y no transportando animales directamente. Aunque queda aún mucho camino por recorrer, vamos en esa dirección. Y constituye una herramienta de reducción de animales utilizados para la investigación y de refinamiento muy potente, tanto a través de un mejor control sanitario y mejor control del genotipo, como una importante mejora del bienestar de los animales a los que les evitaríamos el estrés del transporte.

BIBLIOGRAFÍA

- Pease S. and Saunders T.L (Eds). *Advanced Protocols for Animal Transgenesis. An ISTT Manual*. Springer, 2011.
- *Técnicas básicas de criopreservación de células animales en el ratón. Manual de laboratorio*. Editorial Ciemat. 2004.
- Nagy A., Gertsenstein M., Vintersten K., and Behringer R. *Manipulating the mouse embryo. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2002, Third Edition.
- Hogan B., Beddington R., Constantini F., and Lacy E. *Manipulating the mouse embryo. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1994, Second Edition.

La congelación de un instante

Daniel Baizán Vicent

Embriones, espermatozoides, tejidos vivos. Las posibilidades son infinitas con la criopreservación

Cuando hablamos de criopreservación solemos pensar básicamente que lo más común es la congelación de embriones de ratón. La mayoría de las investigaciones que se realizan suelen tener algún paso en el que los ratones van a ser necesarios.

Todos aquellos que usan ratones en sus investigaciones suelen tener alguno de estos dos temores, o los dos: que su línea de ratón se pierda o que se contamine. Para ambas la solución es clara: embriones criopreservados. En la actualidad la mayoría de centros de investigación tienen su propio sistema de criopreservación. Si se simplificase mucho, sólo sería necesario que alguien conociera el procedimiento de extracción y congelación en nitrógeno para almacenar las muestras. Pero si fuese tan fácil no habría tanta demanda como la hay.

Por todo esto, he ido buscando por la red alguna página web que englobase todas las necesidades que fuesen útiles en la crioconservación y al no encontrar una en concreto os voy a mostrar varias de ellas que aportan cada una un enfoque distinto.

En primer lugar nos detenemos en el proyecto <https://www.infrafrontier.eu/>.

The screenshot shows a grid of service cards on the website. The 'Recursos y Servicios' section includes: 'Depósito ratones' (EMMA archive), 'Orden ratones' (access to 4,000 lines), 'Axénico servicio' (sterile rat lines), 'Archivo NCI GEMM-ESC' (validation service), 'Ratón producción y fenotipificación' (service for researchers), and 'Formación y consultoría' (courses on cryopreservation). Other sections include 'Procedimientos', 'Base de Conocimientos', 'Proyectos', 'Acerca INFRAFRONTIER', and 'Asociación Europea'.

www.infrafrontier.eu
www.cnice.es/es/unidades/transgenesis
criopreservacion.blogspot.com.es

www.infrafrontier.eu
www.cnice.es/es/unidades/transgenesis
criopreservacion.blogspot.com.es

En este caso, vamos a encontrar un conjunto de proyectos que van más allá de la criopreservación, pero no deja de ser una parte importante. Hay que tener en cuenta que una de sus metas es crear y preservar una reserva de ratones mutantes que estén a disposición de los investigadores. Es el llamado INFRAFRONTIER-13.

The screenshot shows the 'INFRAFRONTIER-13' project page. It details the project's objectives, such as developing and maintaining a community of transgenic mouse models, and lists various participating institutions like EMMA, IMPC, INFRACAMP, BioMedBridges, and EMTRAIN. It also includes contact information for the project.

En España existen muchas unidades específicas de criopreservación o de transgénesis. Por eso, sin menospreciar a las demás, me inclino por mostrar una de ellas. La unidad de transgénesis del CNIC

<https://www.cnice.es/es/unidades/transgenesis/>.

En este caso, lo que más me ha llamado la atención es el detalle y la claridad con la que ofrecen toda la información que podamos necesitar a la hora de comprender en qué nos vamos a beneficiar con todo lo que ofrece esta unidad.

Libros y páginas web



Si navegamos por los distintos apartados en los que está dividido, nos daremos cuenta de la minuciosidad con la que han tratado el tema: equipamiento, técnicas, personal, publicaciones. Todo el conjunto denota profesionalidad.

Finalmente, no hay que dejar de hablar de los problemas éticos, bioéticos en este caso, que conlleva la criopreservación desde que se empezó a experimentar sobre ello hace más de medio siglo.

Para aportar una visión sobre esto y dotar de otros datos interesantes como la historia o los conceptos básicos os presento un curioso blog escrito en Chile <http://criopreservacion.blogspot.com.es>.



En él vamos a encontrar datos curiosos sobre la criopreservación, además de la visión particular de los creadores, un grupo de estudiantes de ginecología y obstetricia. Aunque no trata específicamente de investigación animal, nos da una visión

de cómo se van adaptando los descubrimientos científicos a las necesidades humanas.

La criopreservación presenta una infinidad de posibilidades futuras a todos los niveles de la investigación. Desgraciadamente no existe un método que sirva para todas las cepas de ratón. Por eso se debe seguir innovando para encontrar los métodos que mejor se adapten a nuestras necesidades.



www.secal.es



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 físico-químicos de los lotes entregados



Lluís Montoliu José

*Investigador Científico del CSIC
Centro Nacional de Biotecnología, Madrid*

Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL) ¿Qué opinión le merece nuestro colectivo?

No soy miembro de SECAL pero he tenido ocasión de asistir a alguna de vuestras reuniones, como invitado, y me he sentido siempre en familia, entre amigos y colegas. Sea por mis intereses en el campo de la bioética, o en el campo de la transgénesis animal, sea por haber coincidido en muchos otros foros sobre experimentación animal con miembros de SECAL, lo cierto es que sois un colectivo con el que me siento próximo. La SECAL ha hecho una excelente labor divulgando y, sobre todo, formando a personal de nuestro país que trabaja con animales de laboratorio, a través de sus diversas iniciativas educativas, propiciando además la discusión sobre temas candentes en el área, como las sucesivas reformas legislativas que nos han tenido ocupados y preocupados en los últimos años.

Para empezar, ¿en qué consiste la tecnología CRISPR y cuál es el rol del animal de experimentación en ella?

Establecidos los métodos básicos de modificación genética de animales, todos los avances substanciales posteriores han venido siempre de la mano de las bacterias. Con el gen *lacZ* pintamos de azul muchos tejidos y órganos contribuyendo a identificar los patrones de expresión de muchos genes. Con el sistema loxP/cre convertimos las mutaciones constitutivas en condicionales. Con los elementos del operón Tet aprendimos a controlar e inducir la expresión de genes y transgenes. Las CRISPR no podían ser una excepción. El sistema CRISPR-Cas9 es una de las soluciones que inventaron las bacterias y las arqueas, para defenderse de la invasión de genes extraños, provenientes de otros plásmidos o virus. Se trata pues de un rudimentario, pero muy eficaz, sistema de defensa (un prototipo de sistema inmune) de las bacterias. En nuestro país contamos con uno de los microbiólogos que primero descubrieron y estudiaron las CRISPR, desde 1993 (Francisco J. Martínez Mojica, Universidad de Alicante).



Fotografía: Inés Poveda

La tecnología CRISPR-Cas9 está basada en dos elementos, una pequeña molécula de ARN, complementaria a la secuencia que queremos modificar en el genoma de la célula o animal, y una proteína, la Cas9, que es una endonucleasa y corta las dos cadenas de ADN donde le indica ese pequeño ARN director.

Este corte en doble cadena en el material genético de la célula, probablemente una de las agresiones más peligrosas a las que tiene que enfrentarse una célula, induce una maquinaria de reparación ancestral encargada de sellar cuanto antes ese estropicio. Lo que sucede es que el sistema de restauración

comete errores en su desesperada búsqueda de microhomologías para reparar el ADN cortado, y, por ello, frecuentemente añade o quita alguna letra, siendo el resultado final la aparición de inserciones o deleciones (denominadas INDEL) que trastocan la pauta de lectura del gen y se traducen en una mutación. Es decir, dirigiendo el corte de una endonucleasa a un gen determinado fomentamos que aparezca una mutación precisamente en las cercanías de la secuencia utilizada para dirigir el corte.

Es un sistema extraordinariamente eficiente y revolucionario que, trasladado a animales, permite obtener individuos portadores de muchas mutaciones tras inyectar en embriones la combinación de la pequeña molécula de ARN y la que porta información para la nucleasa Cas9. Lo sorprendente del sistema es que, además, puede usarse para introducir o substituir secuencias de ADN a voluntad, si añadimos al cóctel de microinyección un tercer elemento, una molécula de ADN que cubra la zona afectada por el corte y que incorpore alguna alteración determinada, con la esperanza que el sistema de reparación tienda a usar esta molécula de ADN como molde, y acabe trasladando al genoma la modificación genética proyectada. En realidad se trata de un sistema de edición genómica, poderosísimo, con eficiencias de mutación dirigida nunca vistas antes en ratones (valores superiores al 60% de los individuos no son extraños) y con eficiencias de substitución menores pero en vías de mejorar con los constantes avances de la técnica.

Desde el punto de vista de la experimentación animal, las CRISPR permiten hacer el anhelado “recorta, pega y colorea” genómico con el que siempre habíamos soñado los genetistas.

Naturalmente que era posible modificar el genoma de animales de laboratorio, desde los años 80, añadiendo nuevos genes, y poco después, inactivando genes a voluntad, a través de las células pluripotentes embrionales (ES). Sin embargo, estos métodos, en especial la inactivación específica de genes, eran laboriosos y costosos, en tiempo, en dinero y en animales necesarios. Con las CRISPR el campo ha dado un vuelco espectacular, y ahora, en ratones, aquellas mutaciones específicas que necesitaban un año de trabajo para ser generadas, pueden reproducirse en apenas un par de meses, el tiempo suficiente para preparar la modificación genética en el laboratorio (menos de una semana), inyectar en embriones de ratón (menos de una semana), gestarlos en una hembra (3 semanas), y esperar a su destete (3 semanas más). No hay día que no se publiquen variaciones o nuevos ejemplos de uso de las CRISPR, a cual más sorprendente.

Todavía no somos del todo conscientes de la enorme versatilidad que nos dan estas nuevas herramientas para generar rápidamente cualquier modificación genética que deseemos investigar en animales.

Tales ventajas y altísimas eficiencias de edición vienen acompañadas, de momento, con alguna limitación a tener en cuenta, como es la posibilidad de que los cortes (y, por ende, las mutaciones asociadas) se produzcan en otras secuencias similares del genoma, distintas de las inicialmente previstas. La realidad nos dice que estas alteraciones imprevistas se han observado mayoritariamente en células en cultivo, y muy pocas veces en animales, probablemente por las diferencias en los protocolos utilizados. Estoy seguro que el método mejorará (apenas cumplimos ahora dos años desde que lo hemos empezado a aplicar universalmente) y superará o minimizará en lo posible estas y otras limitaciones que puedan aparecer.

¿Qué beneficios puede traer el desarrollo de esta técnica dentro del contexto de genes relacionados con enfermedades en los humanos?

En mi opinión, muchos y enormes. Dejando a un lado las discusiones sobre si los modelos de ratón son útiles para entender las patologías humanas (como siempre en estos casos hay ejemplos para todos los gustos, tanto de modelos que han sido de enorme utilidad como otros que nos demuestran que ratones y humanos tenemos algunas diferencias fisiológicas), lo cierto es que la gran mayoría de ratones mutantes, con inactivación de genes cuyos homólogos en humanos están asociados a enfermedades congénitas conocidas, sean de alta o baja prevalencia (raras), son portadores de mutaciones muy distintas a las observadas en humanos. Y esto es así porque, tradicionalmente, la tecnología de modificación genética en ratones permitía inactivar un gen más fácilmente eliminando una parte antes que substituir apenas una o pocas letras, que es el origen de la inmensa mayoría de mutaciones observadas en genética humana. Con las nuevas herramientas CRISPR ahora la imaginación es el único límite y es por lo tanto posible trasladar al ratón exactamente la misma alteración genética observada en una familia determinada, y compararla con otra observada en otra familia afectada por la misma enfermedad, pero con una presentación clínica distinta, algo que frecuentemente no se comprende y era muy difícil de investigar hasta ahora. Con estos nuevos modelos animales, producidos mediante CRISPR, más ajustados a lo que se observa en patología humana, será posible progresar en nuestro conocimiento de la enfermedad y llegar a

proponer terapias de una forma más eficaz.

Por otra parte, si la tecnología CRISPR permite editar genes es plausible pensar que podría usarse para modificar el genoma humano, para corregir errores congénitos. Las enormes expectativas que la terapia génica suscitó desde los inicios de los años 90, periódicamente pospuestas (con algunas pocas excepciones), pueden dar un vuelco con las CRISPR, que bien podrían emplearse para corregir genes afectados. Primero, claro está, en aproximaciones somáticas, y quizás más adelante, si logramos entender y controlar las limitaciones ya expuestas del sistema, en aproximaciones germinales, que no serían recomendables en estos momentos.

La sociedad se beneficia de la ciencia, pero no piensa de forma científica. ¿Hay aquí un “gen” por descubrir, que determine el equilibrio entre ambas partes?

La ciencia, en especial la biomedicina, había estado tradicionalmente apartada de la sociedad. Al investigador no se le percibía como alguien próximo. Creo, como mucha gente, que el cambio de percepción se produjo tras el nacimiento de la oveja *Dolly*, que todo el mundo conoce, aunque muchos ignoren lo que significó y lo que aportó a la biomedicina. Desde entonces tanto la profesión periodística como la sociedad han empezado a demandar ávidamente información y a reclamar a sus investigadores que dirijan su atención a las enfermedades que nos afectan.

Yo soy de los convencidos que los investigadores, en especial quienes trabajamos desde centros de investigación públicos, financiados por el dinero de todos los contribuyentes, debemos destinar parte de nuestro tiempo a trasladar lo que sabemos, y lo que todavía ignoramos, a la sociedad, en palabras asequibles, sin ocultar nada, compartiendo nuestros logros y nuestros fracasos. Creo sinceramente que es una responsabilidad ineludible. Frecuentemente el colectivo investigador se enfada con la sociedad cuando ésta toma partido por opciones que consideramos no son correctas. Y, en realidad, lo que deberíamos preguntarnos es qué hemos hecho mal para no haber sabido transmitir a la sociedad los elementos necesarios para que pueda entender un determinado avance científico, con sus ventajas y limitaciones. ¿Cómo vamos a preguntarle a la sociedad si está de acuerdo o no con el uso de las herramientas CRISPR para modificar el genoma humano (por referirme a una de las polémicas más recientes) si no somos capaces de explicar primero, en palabras llanas, qué supone, de posible beneficio, y qué puede suponer, también, de riesgo?.

En definitiva, no es que haya un gen por descubrir que determine el equilibrio entre ambas partes, lo que creo que tiene que pasar, en mi opinión, es que los científicos debemos cambiar, colectivamente, y pasar a explicar más frecuentemente, en palabras llanas, aprovechando las habilidades de cada uno, a qué nos dedicamos y por qué es importante que la sociedad en su conjunto, y los gobiernos sucesivos en particular, sigan invirtiendo en ciencia y apostando por ella.

Si no somos capaces de explicar a nuestra abuela o al taxista lo que hacemos, y que lo entiendan, difícilmente tendremos autoridad para trasladar a la sociedad los beneficios reales del progreso científico. Queda mucho por hacer, pero cada vez somos más los que intentamos acercar la ciencia a la sociedad. Somos nosotros, los científicos, quienes tenemos el deber de acercarnos a la sociedad, no esperar a que la sociedad entienda lo que hacemos.

La investigación biomédica es precursora de protocolos para la prevención, curación y control de las enfermedades. ¿Cómo influiría la prohibición del uso de animales de laboratorio en el desarrollo de estos protocolos?

Ni se me ocurre pensar que esto pueda llegar a suceder, pero, si ocurriera, sería una verdadera catástrofe, y un fracaso de todas aquellas personas que trabajamos o investigamos con animales de laboratorio.

Nuestro conocimiento de la fisiología y patología humanas se nutre fundamentalmente de la documentación de los casos, de la observación de personas sanas y enfermas, pero la experimentación necesaria para entender procesos biológicos relevantes, para evaluar posibles terapias paliativas o curativas no puede abordarse, por motivos obvios, en personas. Por ello sigue siendo necesario acercarnos a modelos animales que, aunque distintos a los humanos, comparten un buen número de características fisiológicas, de desarrollo embrionario, de metabolismo a partir de los que inferir lo que ocurre en los seres humanos. Y todo ello abordado desde el mayor respeto y cumplimiento de las recomendaciones en bienestar animal y las normativas de protección de animales utilizados en investigación.

Un ejemplo cercano, de la condición genética rara que investigamos en el laboratorio desde hace más de 20 años, es el albinismo, que ilustra cómo el uso de animales de laboratorio ha permitido avances científicos muy importantes para su

comprensión y posible tratamiento, algo totalmente impensable hace pocos años. Las personas con albinismo, un grupo de anomalías genéticas complejas que incluyen mutaciones en por lo menos 18 genes, pueden manifestar o no ausencia o disminución de la pigmentación, pero lo que comparten todos los tipos de albinismo son unas profundas alteraciones visuales, que son de hecho su principal discapacidad. Utilizando ratones transgénicos, en el año 2006 (1), demostramos que los problemas visuales asociados al albinismo no tenían que ver con la falta de pigmentación sino con el déficit de un metabolito de la vía de la síntesis de la melanina, la L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), la cual, al restaurarla en el sistema mediante un transgén, permitía que los ratones albinos recuperaran la visión, independientemente de su pigmentación. Este descubrimiento dio pie a iniciar diversos ensayos clínicos en pacientes con albinismo, en EE.UU., tratados con L-DOPA (2), para evaluar su posible utilización terapéutica. Nunca hubiéramos podido descubrir el papel tan relevante de la L-DOPA en el desarrollo del sistema visual, y su incidencia directa en albinismo, de no haber usado animales de laboratorio.

Nuestros lectores directos son los socios de SECAL. Nos gustaría hacerles llegar su mensaje en relación a la iniciativa de prohibir el uso de animales en la investigación biomédica.

Personas en contra de la experimentación animal siempre han existido, por diversas razones, como en toda sociedad humana compleja y diversa. En algunos casos sus acciones violentas les descalificaban para cualquier discusión razonable sobre estos temas, pero, recientemente, diversos colectivos, en Europa, se han unido bajo la iniciativa STOP VIVISECTION que pretende trasladar al Parlamento Europeo la necesidad de revisar la Directiva sobre protección de los animales utilizados para fines científicos (2010/63/EU) para promover su anulación, y, con ella, la prohibición de usar animales en investigación biomédica. La utilización selectiva, a conveniencia, de la literatura científica, hábilmente mezclada con postulados en defensa de los derechos de los animales, resaltando donde creen que éstos no se respetan en la Directiva Europea, ha servido para construir una propuesta con una buena dosis de argumentación, (con la que se puede estar de acuerdo o no, muy discutible en mi opinión), pero que sin embargo ha resultado atractiva para más de 1.2 millones de europeos (en su gran mayoría italianos), quienes han aprovechado una herramienta política nueva, la iniciativa europea ciudadana (ECI), para comprometer al Parlamento Europeo a discutir y posicionarse sobre esta proposición. Quienes tenemos una opinión distinta no deberíamos preocuparnos más

allá de lo razonable por este colectivo, ni atacarles por haber presentado esta moción, pues están en su derecho como ciudadanos europeos para forzar la discusión de un tema que ellos consideran relevante en el Parlamento Europeo.

Lo que sí deberíamos hacer es reaccionar, aportar nuestro conocimiento, nuestra experiencia, nuestro punto de vista, nuestros datos reales de nuestros experimentos a quienes tendrán la posibilidad de decidir si apoyan o no esta iniciativa encaminada a prohibir la experimentación animal, esto es, a los europarlamentarios, los representantes de la sociedad europea.

Por ello, desde la COSCE un grupo de personas, preocupadas por la necesidad de explicar mejor los beneficios de la experimentación animal a la sociedad, hemos escrito un documento (3), público, que hemos remitido a nuestros representantes en el Parlamento Europeo, para que dispongan de la información complementaria que necesitan antes de posicionarse, también de quienes defendemos el uso sensato y regulado de la experimentación animal, con respeto al bienestar animal y estricto cumplimiento de la legislación vigente.

Me consta que la SECAL también se ha movilizado para trasladar su opinión a los europarlamentarios, y así se está haciendo también en otros países. No hacer nada no es una opción viable en este caso. Quedarse de brazos cruzados confiando que esta iniciativa no prosperará no es la solución. De nuevo creo que estamos ante un ejemplo en el que es necesario que los diversos colectivos relacionados con la experimentación animal, también los investigadores, nos manifestemos y expliquemos al Parlamento Europeo, y a la Sociedad en general, los beneficios de la misma para la salud humana y animal.

En uno de los puntos creo yo más relevantes del informe COSCE decimos que oponerse a la experimentación animal no es una postura moralmente neutra, como podría parecer, y como se presenta ante la sociedad, dado que, según ellos, no son quienes "dañan" a los animales. Ellos son, aparentemente, sus "defensores". Sin embargo, nada dicen estos colectivos del coste que tendría para la humanidad si no pudieran usarse animales de laboratorio en biomedicina. Si ese coste implicara el aumento del sufrimiento, la imposibilidad de tratar enfermedades y, en definitiva, la pérdida de muchas vidas humanas que dejarían de poder salvarse, entonces la oposición a la experimentación animal no es, en absoluto, una postura moralmente neutra, y requeriría una argumentación de estas consecuencias, argumentación que estos colectivos no parecen estar dispuestos a ofrecer.

Solemos terminar estas entrevistas con la voz propia del entrevistado y por ello le dejamos espacio libre para una reflexión.

Mi primera experiencia con animales de laboratorio se remonta a los años 80, hace más de 30 años, cuando estudiaba Biología en la Universidad de Barcelona. Durante todos estos años he sido testigo privilegiado, en España y en otros países, de cómo hemos profesionalizado, mejorado y optimizado nuestro uso de animales de laboratorio en investigación, implementando parámetros de bienestar animal y adaptándonos sucesivamente a las diversas normativas que han ido apareciendo en respuesta a una voluntad social de mayor respeto y protección de los animales que se utilizan para fines científicos.

Durante todo este tiempo he tenido ocasión de descubrir y asumir que la experimentación animal es un proceso complejo que requiere del trabajo, en colaboración, de diversos colectivos: (1) los cuidadores y técnicos de los animalarios, que se encargan de revisar y mantener los animales en óptimas condiciones, realizando procedimientos cuando es menester; (2) los jefes de los animalarios y los responsables de bienestar animal, que supervisan a los anteriores y son los interlocutores con los investigadores; (3) los técnicos y demás personal de los laboratorios, que son nuestras manos directas en el animalario y (4) también los investigadores, quienes imaginamos y diseñamos proyectos científicos que deben abordarse con experimentación animal. Tras haber trabajado en muchos animalarios y haber coincidido con muchos responsables de animalarios, con quienes frecuentemente he estado de acuerdo, a veces he discrepado, y siempre he discutido y charlado de muchos de estos temas, mi reflexión es que no puede entenderse la experimentación animal sin la exquisita colaboración de los cuatro colectivos anteriormente indicados.

Tengo la sensación, quizás equivocada, de que a veces se ha querido trasladar una imagen de controversia entre investigadores y responsables de animalarios, como si los primeros no tuviéramos sensibilidad ni interés en los temas de bienestar animal y como si los segundos tuvieran como misión bloquear o retrasar los experimentos científicos en base a normas que resultan incomprensibles a los primeros.

Yo quisiera finiquitar con esta reflexión estas polémicas. He tenido la fortuna de trabajar con excelentes jefes y jefas de animalario, con quienes he tenido ocasión de discutir mis

experimentos, escuchando sus sugerencias e intentando encontrar la solución más adecuada a cada problema. No veo otro camino que continuar fomentando esta colaboración.

Tanto los investigadores como los trabajadores y responsables de los animalarios estamos interesados en el bienestar animal, claro que sí, y, por supuesto, todos estamos comprometidos con la experimentación animal, para abordarla de forma correcta. No nos queda otra que entendernos, escucharnos y hacer todo lo posible para potenciar esta colaboración.

Referencias citadas

1. Lavado A, Jeffery G, Tovar V, de la Villa P, and Montoliu L. *Ectopic expression of tyrosine hydroxylase in the pigmented epithelium rescues the retinal abnormalities and visual function common in albinos in the absence of melanin*. J Neurochem. 2006 Feb;96(4):1201-11.
2. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01176435>
3. http://www.cosce.org/pdf/Documento_COSCE_Comision_Animal_Research.pdf



Powering your research development



Profesionales al servicio de la investigación

Servicios integrales para Animalarios

Externalización de servicios de Animalarios

Formación de personal

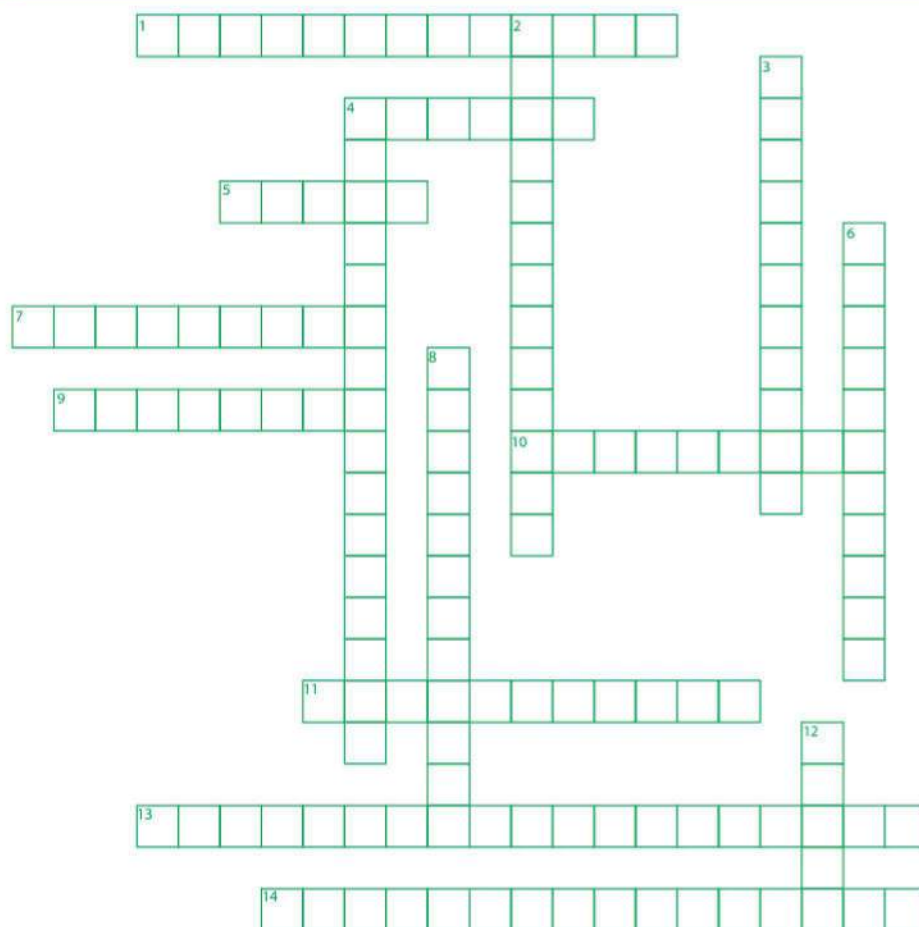
Diseño de Instalaciones

Alquiler y gestión de Instalaciones

Consultoría y Asesoramiento



www.vivotecnia-ms.com



Horizontal

1. Información genética total de una población.
4. Perteneciente o relativo a la cola.
5. Prueba observacional usada para evaluar, en roedores, los efectos de una nueva sustancia en el comportamiento y la función fisiológica.
7. Instrumento quirúrgico para separar los bordes de las heridas, aumentar la exposición del sitio quirúrgico y mejorar la visión dentro de la incisión.
9. Postura en la que la hembra arquea la parte posterior de la columna y eleva los cuartos traseros.
10. Patrón cromosómico de una especie que describe las características de sus cromosomas.
11. Duración de los ciclos de luz y oscuridad.
13. Técnica utilizada para crear organismos transgénicos mediante la inyección e material genético en el núcleo de un oocito fertilizado en la etapa de una sola célula.
14. Dícese de la colonia que consta de animales con el ADN deseado para establecer una expansión.

Vertical

2. Calidad de los embriones de algunas especies que los hace ideales para estudios de desarrollo.
3. Técnica mínimamente invasiva que, a través de catéteres, permite estudiar las patologías congénitas o adquiridas del corazón y del árbol vascular.
4. Proceso por el que las células o tejidos son congelados a temperaturas muy bajas, generalmente -196°C , y poder mantenerlos durante mucho tiempo.
6. Disciplina que estudia el desarrollo fetal anormal en el que se trata a la madre y se observa el efecto en el feto.
8. Tipo de estudio cuyo objetivo es proporcionar datos para generar nuevas hipótesis.
12. Tipo de diseño experimental en el que el investigador no sabe si un sujeto pertenece al grupo experimental o control.



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.