

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

ANIMALES DE LABORATORIO

Verano 2015. Número 66



LOS INICIOS DE SECAL

con Carmina Fernández Criado,
Javier Palacín y Jordi Cantó

Controles sanitarios en ratón,
resultados, centinelas,
sesgo cognitivo y Kahneman.

Esterilización de residuos
patógenos en animalarios BSL-3

Comunicar bien para
investigar mejor



sociedad española
para las ciencias
del animal de laboratorio



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



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

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 Cabezon

PUBLICIDAD

Amaia Enbeita
publicidad.revista@secal.es

FOTO DE PORTADA

Lara Sedó

DISEÑO Y MAQUETACIÓN

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

IMPRIME

LCS REPROGRAF

DEPÓSITO LEGAL
M-1362-1999

Responsables Secciones

Junta de Gobierno



NOTICIAS SECAL ACTUALIDAD
Cristina Gerbolés Freixas
kgerboles@gmail.com



TÉCNICAS
María Granada Picazo
mgpicazo@secam.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@vivotecnica-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

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*

SECAL 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

INDICE

EDITORIAL

8 NOTICIAS

- Actividades de la SECAL.

9 ACTUALIDAD

- Los científicos españoles defienden la experimentación con animales.
- Un nuevo tipo de células madre abre la puerta al desarrollo de órganos de reemplazo.
- Hallado un punto débil para anular la inmortalidad del cáncer.
- Secaleros por el mundo: José M. Peralta.

13 ARTÍCULOS

- Patología, infecciones y controles sanitarios: Introducción.
- Histopatología en estudios con animales de experimentación.
- Patología espontánea en líneas consanguíneas.
- Técnicas de Diagnóstico en Animales de Laboratorio.
- Controles sanitarios en ratón, resultados, centinelas, sesgo cognitivo y Kahneman.

38 REPORTAJE

- Los inicios de SECAL con Carmina Fernández Criado, Javier Palacín y Jordi Cantó.

44 TÉCNICAS

- Implante subcutáneo (heterotópico) y ortotópico de tumores de páncreas para la generación de xenoinjertos derivados de pacientes.

49 PANORAMA

- Esterilización de residuos patógenos en animalarios BSL-3.

53 FACTOR HUMANO

- Comunicar bien para investigar mejor.

58 ALCUIDADO

- Área de lavado.

61 SEGURIDAD EN 5 MINUTOS

- Gases a Presión.

63 ÉTICA Y LEGISLACIÓN

- El utilitarismo y su relación con la *ética animal*.

65 LIBROS Y PÁGINAS WEB

- Ponte en tu piel.

67 ¿YTÚ QUÉ OPINAS?

- Ligar o no ligar: That's the question.
- ¿Más vale solo que mal acompañado?: Evaluación del estrés en *Danio rerio*.

73 CRUSECAL

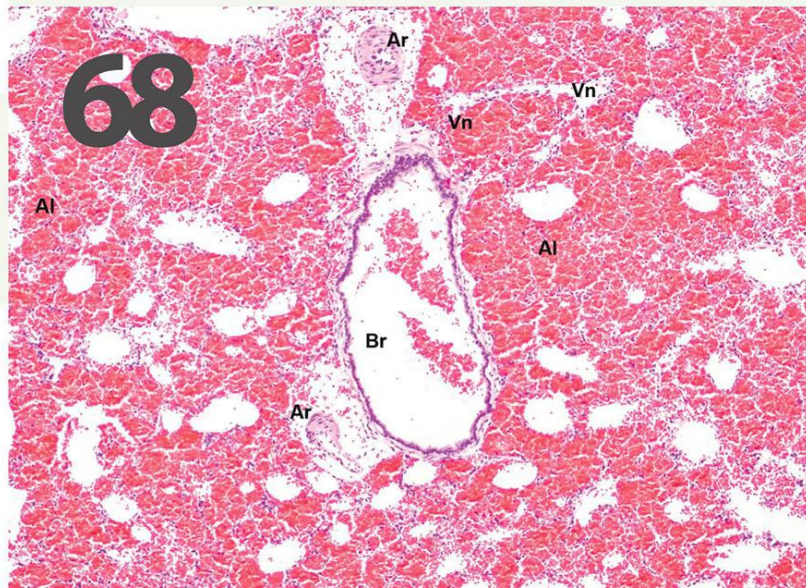




Foto: shutterstock

Un modelo al lado de los humanos

EL VIRUS DEL SARAMPIÓN ES UN MORBILLIVIRUS ALTAMENTE INFECCIOSO RESPONSABLE DE UNA IMPORTANTE MORBILIDAD Y MORTALIDAD EN LOS SERES HUMANOS NO VACUNADOS.

Este hurón, infectado con el virus del Moquillo Canino (perteneciente a la misma familia y género que el del sarampión) ha recibido, recientemente y por vía oral, un inhibidor de la ARN polimerasa viral específica de *morbillivirus*, lográndose una reducida viremia, ausencia de síntomas, recuperación de la infección y supervivencia prolongada. Además, este animal presentó una respuesta inmune excelente y está protegido contra la reexposición al virus.

Estos hallazgos pueden ser pioneros en un camino hacia una terapia efectiva frente a *morbillivirus* y ayudar a la erradicación del sarampión en sinergia con la vacunación. Se abre de esta manera un horizonte esperanzador para lograr cerrar brechas en la inmunidad de grupo, debidas a la polémica negativa frente a la vacunación.

Patógenos y Anticuerpos

La preocupación por conocer el estado de salud de los animales y de si padecen alguna patología que pueda interferir con los resultados, siempre ha estado presente en la experimentación animal.

A lo largo del S. XX, y todavía en la actualidad, el listado de agentes infecciosos que pueden afectar a los animales y alterar los resultados experimentales no ha parado de incrementar. Los avances tecnológicos en las técnicas de diagnóstico han facilitado enormemente el conocer cada vez más a tiempo real, el estado sanitario de los animales. En este número, encontraréis una serie de artículos que tratan de las patologías, las técnicas de diagnóstico y los controles sanitarios de los animales utilizados en experimentación.

Se ha avanzado mucho, pero como en toda disciplina las nuevas respuestas abren nuevos interrogantes y todavía queda camino por recorrer. Un largo camino como el que lleva recorrido la SECAL, que se inscribió como sociedad el 7 de febrero de 1990 y que este año celebra su 25 aniversario. Y como reflejo vivo de esta historia, os presentamos en este número una entrevista especial a tres de los socios fundadores de la SECAL: Carmina Fernández Criado, Javier Palacín y Jordi Cantó. Una entrevista divertida y llena de anécdotas en la que nos explican cómo y en qué condiciones se gestó nuestra sociedad.

Agradecer a Ángel Naranjo la coordinación de los artículos de este número y a Marta Giral, Lola García Olmo, María Granada Picazo y Lara Sedó, la realización de esta entrevista tan especial.

Dirección Revista SECAL



Foto: shutterstock

Actividades de la SECAL

El 17 de junio de 2015 se celebró una reunión ordinaria de la Junta de Gobierno de la SECAL. A continuación, se presenta un resumen de los principales temas tratados en la reunión.

Relaciones internacionales

International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS)

Durante la Asamblea General de ICLAS se realizaron las elecciones para la Junta de Gobierno. Patri Vergara fue reelegida como presidenta y Javier Guillén como representante de los miembros científicos.

Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA)

Se comenta la necesidad de subir las cuotas de membresía. Desde SECAL se propone buscar otras fuentes de financiación y en el caso que finalmente haya de aumentar la cuota, ésta se haga de forma gradual y en el margen inferior (0.5 € más por socio).

Respecto al proyecto con EFPIA (*European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations*), y tras la petición de voluntarios para trabajar sobre la interpretación de diferentes temas de la directiva europea, la distribución es:

- Recursos de evaluación de proyectos: Isabel Blanco.
- Interpretación de términos: Ángel Naranjo.
- Nuevas funciones: Juan Rodríguez como responsable de la Red Española de responsables de Bienestar.
- Transgénicos: M^a Jesús Molina.
- Informes de Severidad: Jose M. Orellana.

Quedan dos temas sin representación: la reutilización y los informes estadísticos.

Iniciativa europea Stop Vivisection

Se ha realizado el informe por parte de la Comisión Europea en el que indican que si bien no se plantean cambios en la directiva, sí van a promover más el tema de los métodos alternativos. Los grupos pro-iniciativa van a recurrir esta decisión, por lo que los grupos que han trabajado contra esta iniciativa van a seguir activos.

Relaciones nacionales

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

Se recibió el borrador del Proyecto de OM de importación de animales no armonizados por la directiva 65/92, roedores y primates, con objeto de aportar comentarios. Desde SECAL se aportaron los comentarios que se recibieron a través de SECAL-L y se transmitió la preocupación respecto al formulario que hay que rellenar para el transporte y que pueden no ser adecuados para el mundo del animal de laboratorio.

Se decide crear un grupo de trabajo con las personas que más han participado sobre este tema a través de SECAL-L, con el objetivo de elaborar unos formularios acordes a la importación de animales de experimentación, material genético congelado, etc.

Y también...

- A 17 de junio de 2015, SECAL tiene 363 socios numerarios y 78 socios benefactores.
- El Congreso SECAL-SPCAL 2015 emitirá un certificado de asistencia al congreso que llevará el programa y las horas de duración de las sesiones para cumplir así las exigencias de la Orden ECC/566/2015 y que sea válido como formación continuada.
- Sergi Vila presenta la nueva web de SECAL.



www.secal.es

sociedad española
para las ciencias
del animal de laboratorio

Los científicos españoles defienden la experimentación con animales

Los científicos españoles levantan la voz en defensa del uso de animales en la investigación biomédica. La Confederación de Sociedades Científicas de España (Cosce) publica un documento oficial en el que defiende que el uso de animales en la investigación es vital para el avance de la medicina.

«La Cosce quiere mejorar la información que se transmite a la sociedad y concienciar a las autoridades ante el riesgo de que surja en España un “activismo virulento” contra la experimentación animal similar al que ya existe en otros países»

En el informe, los autores sugieren incluso la modificación del Código Penal para endurecer las penas por el tipo de delitos en los que determinados grupos activistas contrarios a la experimentación animal puedan incurrir, como liberar animales de un laboratorio para estropear un trabajo científico de años. “Sólo queremos informar para que cualquier persona pueda formarse su opinión”, explica Juan Lerma, coordinador del trabajo y director del Instituto de Neurociencias de Alicante. La Cosce, que agrupa a 75 sociedades científicas españolas, recuerda que la investigación biomédica beneficia directamente a los propios animales, ya que los tratamientos veterinarios modernos se basan en estos estudios.

Prácticamente todos los protocolos actuales para la prevención, curación y control de las enfermedades, de los antibióticos a las transfusiones de sangre, de la diálisis al trasplante de órganos, de las vacunas a la quimioterapia, de las operaciones quirúrgicas de corazón a la sustitución de huesos y articulaciones en cirugía ortopédica, se basan en el conocimiento obtenido mediante investigaciones realizadas con animales de laboratorio.

Los autores del trabajo ofrecen datos para defender que el número de animales utilizados en investigación científica es relativamente pequeño. Entre los autores del informe figuran los vicerrectores de investigación de la Universitat de Barcelona y de la Universidad Autónoma de Madrid, Jordi Alberch y Nuria Fernández; el presidente de la Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio, Javier Guillén; y el investigador Lluís Montoliu, miembro del Comité de Bioética del CSIC, el mayor organismo científico de España.

El informe afirma que los científicos aplican rigurosamente el principio de las 3 Rs: reemplazar por cultivos celulares o simulaciones informáticas el uso de animales cuando es posible, reducir el número de animales empleados a los estrictamente necesarios y refinar los métodos empleados para mejorar el bienestar animal. En cinco años, se han reducido un 34%.

En cuanto al refinamiento de los métodos, el documento pone el ejemplo de unas proteínas fluorescentes. Los investigadores han creado una cepa del parásito que provoca la leishmaniasis con esta proteína fluorescente. Gracias a la proteína, los científicos pueden ver la evolución de la infección con un detector de luz, sin necesidad de sacrificar a los animales. El método, aseguran, reduce hasta un 60% los sacrificios.

El documento detalla decenas de ejemplos que muestran que el uso de animales es esencial en la investigación biomédica. La hormona que produce el páncreas para controlar el azúcar en la sangre, la insulina, se descubrió en perros, y hoy es fundamental para tratar la diabetes. Los estudios en animales, también han sido cruciales para identificar el virus del sida y para la producción de terapias como los antirretrovirales, que han prolongado millones de vidas. La investigación en conejos y perros del virus del papiloma humano, principal causa del cáncer de cuello de útero, demostró que con una vacuna se podía impedir el desarrollo del tumor en las mujeres.

Finalmente, los autores defienden uno de los aspectos más polémicos de la experimentación con animales: el uso de primates no humanos. Los primates desempeñan un papel fundamental en el estudio del cerebro y de la conducta. En la UE, la experimentación con grandes simios está prohibida salvo para la investigación de enfermedades que puedan poner en peligro la conservación de la propia especie o la vida de seres humanos, como el ébola.

“La investigación con animales salva millones de vidas, humanas y animales. Los partidarios de la prohibición tendrán que explicar sus razones para no querer evitar muertes y sufrimiento”, remacha Lerma.

http://elpais.com/elpais/2015/02/19/ciencia/1424361428_621833.html

Un nuevo tipo de células madre abre la puerta al desarrollo de órganos de reemplazo

Un estudio dirigido por Juan Carlos Izpisúa-Belmonte, profesor del Laboratorio de Expresión Génica en el Salk Institute de La Jolla (California), y publicado en la revista *Nature* desvela que en un futuro será posible hacer crecer células, tejidos y órganos humanos en animales para poder reemplazar aquellos que estén dañados debido a enfermedades como la diabetes, las insuficiencias hepática y cardíaca o enfermedades renales.

Incluso para las personas que no necesitan un trasplante inmediato, enfermedades crónicas que afectan a los órganos pueden causar problemas que podrían evitarse mediante la sustitución del órgano dañado o enfermo. No obstante, aparte de la baja disponibilidad de órganos debida a la falta de donantes, también existe el riesgo de que el sistema inmune del receptor rechace el nuevo órgano.

Hasta ahora, las células madre utilizadas en los estudios científicos se clasificaban según su etapa durante el desarrollo embrionario. En este trabajo, los investigadores han encontrado un tipo de células madre que se caracterizan por su localización en el embrión (es decir, que son específicas de una zona en concreto) y que son más fáciles de cultivar en el laboratorio. Así, han utilizado esta nueva característica espacial para integrar células madre humanas en un embrión de ratón mediante su alineación con la posición correspondiente en el embrión de destino.

La diferencia más prometedora entre estas células orientadas en el espacio y las células madre tradicionales es su capacidad para formar una quimera humano-ratón, una combinación de células a partir de las dos especies. La capacidad de hacer crecer tejidos humanos en otras especies -probablemente en cerdos- podría conducir a la creación de órganos de reemplazo para aquellos dañados por una lesión o enfermedad.

"Cuando se han intentado trasplantar tejidos animales en humanos, la incompatibilidad entre ellos ha llevado al rechazo. Si pudiéramos hacer crecer órganos a través de una quimera utilizando las propias células madre del paciente, habría una mayor probabilidad de que los órganos se trasplantaran con éxito", señala Izpisúa-Belmonte.

Esta posibilidad se ha acercado más a la realidad con los últimos avances en la generación de células madre a partir de células somáticas de los pacientes, que son aquellas que ya han dado lugar a un tipo específico de tejido, como la piel.

En estudios previos, se había intentado combinar en el laboratorio células madre humanas con embriones de ratón, tratando de hacer coincidir las etapas del desarrollo. Sin embargo,

los resultados sugirieron que esta metodología no era lo suficientemente fiable para la integración de las células humanas en embriones de ratón.

«El equipo de Izpisúa-Belmonte tomó un enfoque diferente al centrarse en la ubicación, en vez de en el momento, de la incorporación de las células humanas en el embrión temprano de ratón»

Los investigadores desarrollaron un cóctel de señales químicas que consiguió que las células madre embrionarias humanas se orientaran en el espacio en una placa de laboratorio y, concretamente en este caso, se identificaran como parte de la región posterior del embrión. Entonces las insertaron en embriones tempranos de ratón. Para poder comparar esta nueva metodología con las ya existentes, también insertaron, por separado, células madre humanas cultivadas usando métodos convencionales.

Mientras las células madre humanas derivadas a través de métodos convencionales no se integraron en el embrión de ratón, las rPSCs (células pluripotentes de región selectiva) humanas sí que lo consiguieron e iniciaron el proceso de diferenciación a las células de las tres principales capas embrionarias conocidas como ectodermo, mesodermo y endodermo. Cada capa da lugar a tejidos y órganos específicos en el embrión en desarrollo.

Los resultados no sólo proporcionan una nueva forma de estudiar el desarrollo humano temprano, sino que también ofrecen una nueva esperanza para el cultivo de tejidos y órganos humanos en un animal huésped.

Josep Maria Campistol - director Médico del Hospital Clínic, investigador del IDIBAPS y coautor del estudio - señala que "esta técnica es completamente novedosa en el cultivo de las células madre en un laboratorio y ofrece información muy relevante sobre cómo las células madre humanas podrían incorporarse a un embrión de una especie diferente. Todo este conocimiento podría ser crucial para generar diferentes tipos de células funcionales y maduras para la medicina regenerativa".

<http://www.agenciasinc.es/Noticias/Un-nuevo-tipo-de-celulas-madre-abre-la-puerta-al-desarrollo-de-organos-de-reemplazo>

Wu J., Okamura D., Li M., et al. *An alternative pluripotent state confers interspecies chimaeric competency*. Nature 2015, 521:316-21. doi:10.1038/nature14413.

Hallado un punto débil para anular la inmortalidad del cáncer

Científicos del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) han descubierto una nueva estrategia para combatir el cáncer, totalmente diferente a las ensayadas hasta ahora. El trabajo demuestra, por primera vez, que los telómeros, estructuras que protegen los extremos de los cromosomas, pueden ser una diana efectiva contra el cáncer: El bloqueo del gen TRF1, esencial para los telómeros, induce drásticas mejoras en ratones con cáncer de pulmón.

Cada vez que las células se dividen duplican su material genético, que está empaquetado en los cromosomas. Sin embargo, el extremo de cada cromosoma no es copiado por completo y, como consecuencia, en cada división los telómeros se acortan. Los telómeros excesivamente cortos son tóxicos para la célula, que deja de replicarse y acaba siendo eliminada por los sistemas de limpieza celular.

Este proceso no afecta a las células tumorales, que pueden dividirse descontroladamente sin que sus telómeros se acorten demasiado. Esto se debe a que en las células tumorales, a diferencia de las células sanas, se mantiene activada la enzima telomerasa, que repara constantemente los telómeros y permite a las células tumorales dividirse sin fin.

Una estrategia obvia para combatir el cáncer sería inhibir la telomerasa en las células tumorales. Sin embargo, esto ya se realizó sin obtener resultados óptimos, ya que aunque los telómeros efectivamente se acortaban, el acortamiento era demasiado lento y la muerte de las células tumorales tardaba en llegar.

Los telómeros están formados por una secuencia de ADN repetida cientos de veces a la que se enganchan seis proteínas llamadas shelterinas (del inglés shelter, protección), que forman una especie de capuchón protector. La estrategia del equipo del CNIO ha sido bloquear una de las shelterinas, en concreto, la TRF1, de forma que se destruya el escudo protector.

“La desprotección de los telómeros emerge como potencial nueva diana terapéutica para el cáncer”, escriben en *EMBO Molecular Medicine* los autores del estudio.

«*María Blasco, directora del CNIO y líder del estudio, explica que la elección de la proteína TRF1 como objetivo del tratamiento se debe también a su papel esencial para la generación de células madre del cáncer. Estas células, se cree, están detrás de las recaídas de la enfermedad y convierten a la proteína en una diana con interés doble*»

“Cuando se elimina TRF1 se induce una desprotección instantánea de los telómeros, lo que a su vez hace que las células entren en senescencia o mueran. Vemos que esta estrategia mata eficientemente las células del cáncer, frena el crecimiento tumoral y tiene efectos tóxicos tolerables”, explica Blasco.

Los autores crearon ratones con un tipo de cáncer de pulmón muy agresivo y observaron las consecuencias de anular TRF1 de dos formas diferentes. Por un lado, bloquearon genéticamente el gen que produce la proteína en ratones con cáncer de pulmón y en ratones sanos. Y por otro lado, emplearon un inhibidor químico, desarrollado en el CNIO, que a largo plazo podría ser la herramienta para convertir este descubrimiento en tratamiento para humanos.

Según explican los autores, esta técnica impidió el crecimiento de tumores de pulmón en ratones. Además, se comprobó que bloquear las shelterinas con un fármaco no produce efectos tóxicos excesivos en las células sanas.

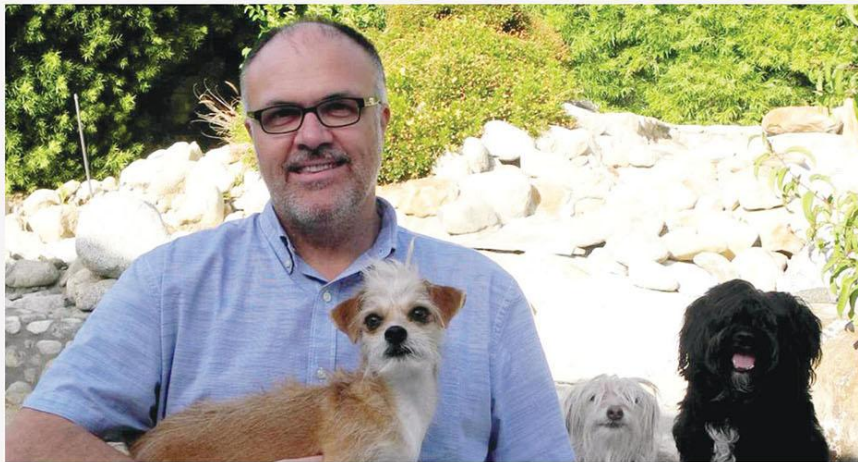
En ambos casos, a diferencia de lo que sucedía cuando se bloqueaba la telomerasa, el efecto es instantáneo. Se genera el daño directamente sobre el telómero, a diferencia de la quimioterapia que daña todo el genoma. Este daño, más localizado, es suficiente para desproteger a los cromosomas del cáncer y al mismo tiempo tiene una menor toxicidad. “En los tejidos que crecen más rápido, como la médula ósea, es algo mayor, pero similar a una quimioterapia suave”, concluye Blasco.

https://www.cnio.es/es/newa/docs/maria_blasco_13may15_es.pdf

http://elpais.com/elpais/2015/05/12/ciencia/1431448816_517221.html

García-Beccaria M., Martínez P., Méndez-Pertuz M., et al. *Therapeutic inhibition of TRF1 impairs the growth of p53-deficient K-RasG12V-induced lung cancer by induction of telomeric DNA damage*. *EMBO Molecular Medicine* 2015, doi:10.15252/emmm.201404497.

Secaleros por el mundo



José M. Peralta

Este secalero, que ya lleva más de 25 años al otro lado del Atlántico, nació en Alicante, aunque no tiene familia en esa bonita ciudad del mediterráneo, sino que ocurrió porque su padre trabajaba allí en aquella época. Su familia lleva ya más de 30 años en Zaragoza, que es donde se ubica su campamento base cuando regresa a España de vacaciones. Estudió veterinaria en la Universidad de Zaragoza y al acabar, su espíritu aventurero le llevó a buscar, a través del club de IVSA (*International Veterinary Student Association*) de la facultad, oportunidades para hacer una estancia en una clínica de Estados Unidos.

Pasó seis meses en Denver en un hospital de perros y gatos. Al regresar a España, se enteró que el Ministerio de Agricultura ofrecía becas de doctorado en el extranjero y mandó su solicitud. Aunque, como la mayoría de sus compañeros, durante la carrera nunca pensó que trabajaría en investigación ni con animales de experimentación, tenía interés en la enseñanza y la posibilidad de hacer un doctorado se le había pasado por la cabeza.

Con esa beca del Ministerio de Agricultura bajo el brazo, en 1990 se matriculó en un programa de estudios de posgrado en la Universidad de Cornell, en el estado de Nueva York, donde terminó pasando casi 20 años (¡y no todos como estudiante!). Allí, entre otras hazañas, conoció a su mujer, la patóloga veterinaria Ana Alcaraz, y tuvieron a su hija Amaya, que ahora es una quinceañera muy maja.

Fue durante su etapa de estudiante que, casi por casualidad, le invitaron por primera vez a ser miembro del comité de ética de uso de animales de investigación (el IACUC como lo llaman en esa parte del mundo). El hecho es que sin saber cómo pasó y casi sin quererlo, ya lleva más de 20 años en

este mundo de los aspectos regulatorios y éticos del uso de animales.

Tras terminar su maestría y doctorado, en 1997, aceptó una oferta para quedarse en la Facultad de Veterinaria de Cornell dando clases de Bienestar Animal y Ética, y como veterinario del Comité, a cargo sobre todo de los proyectos con animales de granja. Tras 10 años en ese trabajo, en 2007, tanto él como su mujer aceptaron ofertas para irse como profesores, ella de Patología y él de Bienestar Animal y Ética, al sur de California, a la *Western University of Health Sciences*. En la actualidad viven con sus tres perros en las afueras de Los Ángeles.

Además de sus responsabilidades académicas, trabaja en proyectos de investigación sobre bienestar animal muy variados e interesantes, desde el empleo de hielo para el enriquecimiento ambiental en cerdos, pasando por el uso de sombra durante el verano en terneras lecheras hasta el posible empleo de termómetros de rayos infrarrojos para medir la temperatura de manera menos invasiva, que por vía cloacal, en aves exóticas.

Sigue involucrado en comités de ética y, en la actualidad, está contratado como veterinario en los comités de tres instituciones locales distintas. Lleva desde 1999 como consultor voluntario de la Asociación para la Evaluación y Acreditación de Programas de Cuidado de Animales de Laboratorio (AAALAC). Con ellos ha visitado numerosos centros de investigación con animales en Estados Unidos, España y otros países latinoamericanos.

En 2007, fue invitado a participar en el comité organizador del *American College of Animal Welfare*, del que hoy en día es Diplomado. Más recientemente, recibió su Diplomatura del *European College of Animal Welfare and Behavioural Medicine*.

En 2015, durante la Convención Anual de la *American Veterinary Medical Association* (AVMA) en Boston, se le otorga un premio nacional que reconoce su actividad y dedicación como veterinario trabajando en el área del bienestar animal. Será el primer veterinario español que recibe el prestigioso *AVMA Animal Welfare Award*.

Patología, infecciones y controles sanitarios: Introducción

Ángel Naranjo Pino

Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC)

Desde el inicio de la experimentación animal con ratones, las patologías que padecían y los resultados experimentales han ido de la mano.

Los ratones de laboratorio son un mosaico de genomas de diferentes especies y "razas" del género *Mus*. Criadores como Abbie Lathrop, y científicos como Clarence Cook Little, Leo Loeb, Ernest Tyzzer y Leonell Strong, fueron pioneros a la hora de crear, caracterizar y utilizar estirpes de ratones de laboratorio. En muchas ocasiones, estas estirpes fueron seleccionadas por sus características genéticas y su susceptibilidad a sufrir patologías, como tumores espontáneos. A la vez que estudiaban estas susceptibilidades a sarcomas y leucemias, y su relación con el genoma, se describía la aparición de diarreas, abscesos hepáticos e infecciones parasitarias más propias de estar causadas por agentes infecciosos.

Partiendo de las estirpes que habían desarrollado los criadores, como los "waltzing" originarios de Japón, se fueron incorporando porciones de genoma de otros ratones. En muchas ocasiones provenientes de ratones silvestres que, además de proporcionarles genoma a las nuevas estirpes, también les proporcionaban agentes infecciosos.

Así como Lathrop, Little y Strong son considerados los pioneros en el desarrollo de las primeras líneas consanguíneas de ratón (DBA, C57BL, C3H, CBA, A, etc.), Tyzzer, además de participar también en la creación de alguna de estas estirpes de ratón, desarrolló gran parte de su trabajo en la descripción de patologías asociadas a agentes infecciosos. Fue el primero en describir las infecciones por parásitos del género *Cryptosporidium* (*C. muris*, *C. parvum*) y una nueva patología, la enfermedad de Tyzzer, provocada por bacterias intracelulares (*Clostridium piliformis*; Tyzzer, 1917)

Desde un principio ya se observó en varias estirpes de ratón que a su composición genómica iban asociados una serie de

retrovirus: Virus del Tumor Mamario en ratón (MMTV), o el Virus de la Leucemia Murina (MuLV) que les conferían, a estas estirpes, una prevalencia alta en ciertos tipos de tumores. En algunos casos, algunas poblaciones de ratones también tenían incidencias altas de tumores, por agentes infecciosos, que se identificaron posteriormente como el virus de polioma murino.

Entre los años 30 y 50 se describieron una serie de enfermedades víricas y bacterianas en las colonias de ratón, aunque en algunos casos el agente etiológico fue descrito posteriormente: el virus ectromelia (1930), el virus de la encefalomiелitis del ratón (1934), el virus de la coriomeningitis linfocítica (1935), enfermedad respiratoria crónica causada por micoplasmas (1937), la diarrea epizootica de ratones lactantes (EDIM) causada por rotavirus (1947), coronavirus como el JHM del grupo de los virus de la hepatitis del ratón (1949),...

Entre los años 50 y 60 siguieron describiéndose nuevos virus que afectaban a las colonias de ratones: el virus de la lactato deshidrogenasa (LDHV), citomegalovirus, adenovirus del ratón, polyomavirus, reovirus, y el MVM.

A partir de los años 60, viendo la importancia que tenían estos agentes en los resultados experimentales, diferentes instituciones (CDC, NIH, ILAR) impulsaron reuniones, conferencias y publicaciones alrededor de las enfermedades infecciosas en ratas y ratones de laboratorio.

A partir de los años 90 y de forma esporádica, han ido apareciendo nuevos agentes que suman al listado de agentes infecciosos que se encuentran en los ratones de laboratorio, y que pueden interferir con los resultados experimentales: Parvovirus del ratón (1993), *Helicobacter hepaticus* (1994) y Norovirus del ratón (2005).

La lista de agentes infecciosos presentes en los ratones y susceptibles de alterar los resultados experimentales se cifra

entre 60 y 100, dependiendo de las divisiones que hagamos de los agentes.

Existen muchas publicaciones en las que se describen la presencia de estos patógenos en las colonias de ratones de laboratorio y en algunos casos, las interacciones de estos agentes con los resultados experimentales (Baker, 1998; Jacoby and Lindsey, 1998; Fox *et al.*, 2007; Percy and Barthold, 2007), pero no está tan claro si a todos estos microorganismos podemos clasificarlos claramente como agentes que interfieren con los resultados experimentales, o son más bien microorganismos propios de la flora normal de los ratones que han evolucionado conjuntamente con la formación de las estirpes de ratones de laboratorio. Recordemos que el genoma del ratón de laboratorio, secuenciado en el 2002, revelaba retrovirus y retroelementos insertados en el genoma (Percy and Barthold, 2007) que en ocasiones han dado lugar a los fenotipos característicos de las estirpes de ratón. Por ejemplo, la inserción de un virus de la leucemia murina (Xmv-28) en el gen *Pde6b*, un receptor de los bastones de la retina, en la cepa de ratones C3H provocó la aparición en la población del alelo *rd1* (degeneración retinal). Actualmente, las cepas relacionadas con C3H sufren una ceguera progresiva a partir de la edad de destete.

Con el crecimiento exponencial de modelos de ratones modificados genéticamente (RMG) es prácticamente imposible descartar qué agente puede o no afectar, de alguna manera, al fenotipo y a los resultados que obtengamos con alguno de estos modelos de ratón. Alteraciones en la morfología de las mucosas intestinales, o en la funcionalidad de las células mucociliares, pueden no ser interpretadas como inmunodeficiencias y, sin embargo, provocar alteraciones en la susceptibilidad de patologías por microorganismos residentes en tales nichos.

Los microorganismos pueden afectar a la investigación provocando signos clínicos evidentes y mortalidad, lo que nos lleva a darnos cuenta de su presencia. Sin embargo, en la mayoría de los casos los microorganismos provocan alteraciones subclínicas, modificaciones fisiológicas poco evidentes, cambios histológicos, o alteran el punto final de los estudios. Y aunque, en algunos casos, exista un debate científico sobre hasta qué punto a un agente se le puede definir como importante, lo que sí es una opinión generalizada es que los ratones, al igual que otros reactivos biológicos, como los cultivos celulares, necesitan estar caracterizados microbiológicamente para dotarlos de sistemas de calidad, y posteriormente poder analizar los resultados

obtenidos descartando interferencias de microorganismos con los resultados experimentales.

Por ese motivo, y con el intercambio masivo entre instituciones, se han venido desarrollando y estandarizando sistemas de control sanitario en las colonias de ratones que nos proporcionen una visión global del estado sanitario de los animales que se utilizan. Los informes sanitarios son imprescindibles para aceptar envíos y evaluar el riesgo de introducir microorganismos no deseados en los animalarios.

Cada animalario tiene unas características diferentes (instalación, barreras, estirpes de ratones, líneas de investigación, presupuesto, etc.) que hace que los controles sanitarios puedan llegar a realizarse con enfoques muy diferentes, dificultando la comprensión externa del estado sanitario de las colonias de ratones.

Desde los años 80 se han venido publicando recomendaciones sobre cómo realizar los controles sanitarios. FELASA, en 1994, tratando de unificar y armonizar los programas de control sanitario y los informes sobre la salud de los animales de experimentación, publicó las primeras recomendaciones sobre el control sanitario de roedores y lagomorfos en unidades de cría. Posteriormente, se publicaron recomendaciones sobre las unidades de experimentación y sobre unidades con otras especies de animales. Estas recomendaciones han servido de base a los informes sobre la salud de los animales de criadores y unidades experimentales, fundamentalmente a nivel europeo. Y es por eso que muchos de los informes realizados en programas de control sanitario ponen en sus encabezados "Siguiendo las recomendaciones de FELASA".

De igual manera que FELASA trató de armonizar los programas a nivel europeo, AALAS en USA y Japón (las otras dos áreas más importantes de experimentación animal) también acordó armonizar sus programas en diversas conferencias. En la última década, y debido a que los envíos de roedores se producen a nivel mundial, siendo imposible restringirlos por áreas, AALAS y FELASA han creado grupos de trabajo para armonizar el formato de los informes sanitarios que acompañan a los ratones en estos envíos.

Las recomendaciones de FELASA han supuesto un avance en la definición microbiológica de los ratones utilizados en experimentación y en la evaluación de los programas de control

sanitario a través de los informes sanitarios. Dichas recomendaciones establecen unos principios sobre los agentes a analizar, la frecuencia, las pruebas, el número de animales y las unidades microbiológicas, que requieren de un compromiso de las instituciones con recursos humanos y monetarios no siempre disponibles.

Aunque dichas recomendaciones dan unas pautas a seguir, es necesaria la intervención del responsable en salud animal para diseñar el programa de acuerdo a las características de los centros, seleccionar las muestras, las pruebas, realizar las necropsias, e interactuar con los laboratorios y los patólogos, para poner todo en conjunto y emitir un informe que refleje el estatus microbiológico de la colonia.

En los próximos artículos discutiremos cuáles son los posibles errores que podemos cometer al diseñar programas de control sanitario. Repasaremos cómo se realiza una necropsia para la toma de muestras, ya que el auge de pruebas diagnósticas como la PCR o MFIA ha dejado de lado la evaluación macroscópica, que puede revelar patologías causadas por agentes diferentes para los que están diseñadas estas pruebas. Veremos cuáles son los pros y los contras de los diferentes tipos de pruebas. Y describiremos cuáles son las principales patologías espontáneas que podemos encontrar en ratón, y que nunca debemos confundir con los resultados experimentales ni con el resultado de agentes infecciosos presentes en los animales.

BIBLIOGRAFÍA

- Baker J.J. *Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice.* Science 1936, 84:162.
- Baker J.J. *Milk-influence of breast tumors in mice.* Science 1942, 95:462-3.
- Baker D.G. *Natural Pathogens of Laboratory Mice, Rats, and Rabbits and Their Effects on Research.* Clin Microbiol Rev 1998, 11(2): 231-66.
- Barthold S.W. *Microbes and the Evolution of Scientific Fancy Mice.* ILAR J 2008, 49(3):265-71.
- Cheever F.S., Daniels J.B., Pappenheimer A.M., et al. *A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin: I. Isolation and biologic properties.* J Exp Med 1949, 90:181-94.
- Cheever F.S. and Mueller J.H. *Epidemic diarrheal disease of suckling mice. I. Manifestations, epidemiology, and attempts to transmit the disease.* J Exp Med 1947, 85:405-16.
- Cotchin E. and Roe F.J.C. *Pathology of Laboratory Rats and Mice.* Oxford: Blackwell Scientific Publications 1967.
- Fox J.G., Barthold S.W., Davisson M.T., et al. *The Mouse in Biomedical Research: Diseases* (2nd Ed, vol II). San Diego: Academic Press/Elsevier 2007.
- Jacoby R.O. and Lindsey J.R. *Risks of Infection among Laboratory Rats and Mice at Major Biomedical Research Institutions.* ILAR J 1998, 39(4): 266-71.
- Lindsey J.R., Boorman G.A., Collins M.J.Jr., et al. *Infectious Diseases of Mice and Rats.* Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council Washington: National Academy Press 1991.
- Little C.C. and Tyzzer E.E. *Further experimental studies on the inheritance of susceptibility to a transplantable tumor, carcinoma (J.w.A.) of the Japanese waltzing mouse.* J Med Res 1916, 33:393-453.
- Little C.C. and Tyzzer E.E. *Studies on the inheritance of susceptibility to a transplantable sarcoma (J.w.B.) of the Japanese waltzing mouse.* J Cancer Res 1916, 1:387-9.
- Mouse Genome Sequencing Consortium. *Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome.* Nature 2002, 420:520-62.
- Mähler M., Berard M., Feinstein R., et al. *FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units.* Lab Anim 2014, 48(3):178-92
- Nicklas W., Baneux P., Boot R., et al. *Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units.* Lab Anim 2002, 36(1):20-42
- Percy D.H. and Barthold S.W. *Pathology of Laboratory Rodents and Rabbits* (3rd Ed). Ames: Blackwell Publishing 2007.
- Reh binder C., Baneux P., Forbes D., et al. *FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, gerbil, guinea pig and rabbit experimental units.* Lab Anim 1996, 30(3):193-208
- Singleton G.R. and Krebs C.J. *The secret world of wild mice.* In J.G. Fox, S.W. Barthold, M.T. Davisson MT, et al. (Ed.). *The Mouse in Biomedical Research. I. History, Wild Mice, and Genetics.* San Diego: Academic Press/Elsevier 2007.
- Tyzzer E.E. *A fatal disease of the Japanese waltzing mouse caused by a spore-bearing bacillus (Bacillus piliformis, N. SP.).* J Med Res 1917, 37:307-38.

Histopatología en estudios con animales de experimentación

Manuel Pablo Olmo⁽¹⁾ y Ana Isabel Nieto Ruiz de Zárate^(1,2)

¹Anapath, Laboratorio de Anatomía Patológica, Granada

²Unidad de Experimentación Animal, Universidad de Granada

El estudio de los cambios morfológicos que se producen en los tejidos como consecuencia de las enfermedades o de tratamientos específicos, es una parte importante de muchos de los proyectos que utilizan animales de experimentación. Como ciencia, la anatomía patológica es a la vez descriptiva e interpretativa, ya que evalúa - en una imagen fija en el tiempo y en dos dimensiones - una pieza tridimensional, en la que por un lado es necesario distinguir cambios que entran dentro de la normalidad de las alteraciones patológicas, y por el otro, deducir qué ha pasado en el curso de la enfermedad para llegar a ese punto. En otras palabras, se requiere conocer la patogénesis de las enfermedades y su impacto en los órganos para de esta manera, a partir de las lesiones presentes en los tejidos, deducir el curso del proceso y llegar a una posible etiología. De ahí que sea esencial contar con unas muestras adecuadas, pero también con un patólogo con la experiencia suficiente en animales de experimentación.

Para conseguir que los resultados de los estudios anatomopatológicos sean realmente útiles, todo el equipo que forma parte del proyecto debe tener unos conocimientos básicos, al menos en cuanto al procesamiento de las muestras y a los datos que el patólogo va a necesitar para interpretar los hallazgos. Además, el contar con unos mínimos conocimientos de la terminología empleada en los informes puede ayudar a encajar los resultados de la histopatología con el resto. Por esto, en este artículo, vamos a describir resumidamente cómo documentar los hallazgos, cómo preparar las muestras y una relación de los términos que con más frecuencia nos encontraremos en los informes del patólogo, con ejemplos de patologías que solemos encontrar en animales de experimentación.

INFORMACIÓN NECESARIA DEL EXPERIMENTO

El primer paso para una identificación e interpretación correcta de las muestras es contar con un informe, lo más detallado posible, del experimento del que proceden. Éste debe

incluir principalmente la especie, cepa, si se trata o no de animales modificados genéticamente, la edad de los animales y los hallazgos macroscópicos encontrados en la necropsia. Si se ha empleado un tratamiento con alguna sustancia, también resulta información valiosa la ruta, la dosis y la duración de dicho tratamiento. Asimismo, la aparición de signos clínicos, como cambios en el peso y en el consumo de alimentos, junto con los resultados de estudios de hematología, bioquímica o peso de órganos, nos pueden ayudar a identificar los órganos diana o los mecanismos de toxicidad. Por otro lado, los datos farmacocinéticos pueden ayudar a la interpretación de los resultados.

En general, existe un consenso entre los anatomopatólogos sobre el impacto negativo que los estudios "ciegos" tienen en la evaluación histológica, sobre todo en toxicología. Estos estudios suponen una reducción en la sensibilidad y un incremento de la subjetividad a la hora de identificar cambios que dificulta, por ejemplo, la demostración de una relación con la dosis administrada. En caso de ser estrictamente necesaria la evaluación de las muestras sin identificar los grupos, al menos es importante conocer los grupos no tratados para poder establecer lo que se considera variación normal de la especie o cepa y, a partir de ahí, poner el foco sobre aquellas lesiones, en muchas ocasiones sutiles, que aparecen sólo en los animales tratados. Aunque sí suelen hacerse revaluaciones ciegas de los hallazgos en tejidos específicos para ratificar el diagnóstico y la aplicación de los grados de severidad de forma consistente.

PROCESADO DE LAS MUESTRAS

Las muestras se remiten inmersas en fijadores adecuados, en una proporción 1:10 (1 parte de muestra por 10 de fijador). Normalmente se utiliza formaldehído tamponado al 10% o fijadores específicos para algunos tejidos, como líquido de Bouin para testículos y tejidos muy blandos, o Zenker para órganos linfoides. También pueden enviarse en un *buffer* como el PBS y refrigeradas si van a procesarse congeladas. En este caso, el

tiempo que transcurre desde la toma de muestras hasta la congelación es esencial.

En el caso de estudios de varios grupos de tratamiento, es muy importante que las muestras se hayan recogido en una misma localización para evitar la variabilidad. Por ejemplo, si se toman muestras de cavidad nasal, de páncreas y sobre todo del sistema nervioso central (SNC), éstas deben hacerse en el emplazamiento habitual del órgano, ya que la composición celular puede variar según la zona, lo que dificultaría la comparación de los resultados. Por otro lado, puede ser necesario reducir el tamaño de la muestra, eligiendo la parte más significativa para facilitar la fijación.

También el tallado y la orientación de la muestra a la hora de elaborar los bloques de parafina o de congelación deben realizarse siguiendo unos protocolos estandarizados para cada órgano, con el fin de conseguir secciones similares de los órganos y tejidos. En los casos en los que no sea posible, esta circunstancia debe tenerse en cuenta a la hora de llevar a cabo el estudio histológico y comparar los resultados.

En general, se emplea la tinción de hematoxilina y eosina para la evaluación de los tejidos. Sin embargo, pueden ser necesarias algunas técnicas especiales si queremos poner de manifiesto algunas patologías, como por ejemplo la fibrosis - para la que se utiliza la técnica de Tricromico de Masson -, la desmielinización del SNC - con la tinción de Luxol Fast Blue -, o depósitos de mucopolisacáridos - mediante el Ácido Peryódico de Schiff (PAS). Las técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) nos ayudan al diagnóstico al marcarnos exactamente lo que queremos identificar, pero tienen el inconveniente de que encarecen mucho un estudio.

EVALUACIÓN

A la hora de evaluar las preparaciones histológicas se pueden hacer dos aproximaciones, una de tipo interpretativo y la otra descriptiva. La primera es la que lleva a cabo un diagnóstico en base a las observaciones realizadas, pero también incorporando datos históricos y clínicos basados en el conocimiento del patólogo que la realiza. Éste es el análisis clásico de la anatomía patológica y el que se emplea, por ejemplo, en estudios de cáncer o fenotipado de nuevos animales transgénicos.

El estudio descriptivo de las muestras es el más utilizado en estudios de toxicología. En este caso, se trata de recoger una serie

de cambios microscópicos, lo más consistentes y objetivos posibles, que nos permitan establecer las diferencias entre los grupos de tratamientos.

Así, un ejemplo de informe interpretativo sería aquel en el que se recoge que la lesión presente es una hepatitis. Es un proceso que afecta a hígado y que incluye un incremento del flujo sanguíneo (congestión), salida de plasma y proteínas desde los vasos (edema), y marginación y emigración leucocitaria. Si la inflamación se prolonga en el tiempo es una hepatitis crónica y aparece, además, destrucción de tejido de granulación y/o fibrosis (cirrosis). Por otro lado, del término hepatitis se pueden inducir una serie de cambios bioquímicos o clínicos. En un informe descriptivo, se enumerarían cada uno de estos cambios por separado para tener un mayor número de elementos diferenciales entre los grupos. Este informe suele ser más objetivo ya que reduce los errores de concepto de algunos diagnósticos. No obstante, en estos informes, la interpretación del proceso aparece normalmente en la parte de discusión o conclusiones.

Umbrales

Antes de empezar el estudio, el patólogo debe establecer cuáles son los cambios que se van a considerar normales en relación con el sexo, la edad, las variaciones anatómicas, y que por tanto, no van a ser recogidos en el informe. Estos cambios, denominados umbrales, también aparecen en los animales del grupo control sin tratar. A partir de aquí, aquellos hallazgos que superen esos umbrales, serán considerados patológicos y comentados en el informe.

Grados de severidad

Junto con la descripción de la lesión, en el informe aparece el grado de severidad. En general, se trata de una combinación de la distribución, intensidad de los cambios y extensión de la lesión, para los que se establecen 4 o 5 valores semicuantitativos (ver Tabla 1). En algunas ocasiones se puede incluir también el porcentaje del órgano afectado. Hay que tener en cuenta que el grado de lesión varía según el proceso sea agudo o crónico. Para algunas lesiones, no es posible incluir grados de severidad y normalmente éstas se recogen en los informes como presentes/ausentes. Algunos ejemplos serían las neoplasias, quistes o anomalías congénitas.

Con los valores obtenidos se puede hacer un análisis estadístico para ver una tendencia, pero no es aconsejable sacar

Conclusiones globales de estos análisis porque podemos estar mezclando criterios distintos. Por ejemplo, un infiltrado severo de neutrófilos en el parénquima renal nos daría un valor de 4 en la escala semicuantitativa. Este mismo valor lo obtendríamos en una fibrosis severa en el riñón. Pero ambos hallazgos tienen significados diferentes ya que, en este último caso, el proceso está probablemente más avanzado en el tiempo y ha desembocado en una lesión que es ya irreversible, mientras que en el primero, la lesión puede aún revertirse. Por esto, al analizar los datos, hay que tener en cuenta los valores asignados y también lo recogido en el informe del patólogo.

CLASIFICACIÓN DE LOS GRADOS DE SEVERIDAD DE 1 A 4	
Grado 0	Normalidad. En el tejido/ órgano analizado no se observan cambios diferentes a los esperados en función de la edad, sexo y cepa del animal.
Grado 1	Mínimo. Pequeños cambios que exceden a los considerados normales.
Grado 2	Medio. Los cambios son evidentes pero su importancia es menor.
Grado 3	Moderado. Cambios muy evidentes pero que no ocupan la mayoría del órgano.
Grado 4	Severo. Los cambios son completos y afectan a la mayor parte de la muestra analizada.

Tabla 1.- Ejemplo de tipo de clasificación de los grados de severidad de las lesiones (Mann *et al*, 2012).

Modificadores

Además del nombre de la lesión y el grado de severidad, a veces es necesario incluir información adicional como la localización en el órgano, la distribución, el tipo o duración de los cambios. Son los llamados modificadores (ver Figura 1). El lugar de la lesión es importante en órganos complejos, en los que una enfermedad o un tóxico pueden afectar a un sitio concreto de ese órgano. Un ejemplo claro es el encéfalo en el que cada patología está asociada a una localización en el mapa, o el hígado en el caso de los tóxicos, en el que la patología del proceso es diferente si la lesión es cerca del espacio porta (periportal), mediozonal o cerca de la vena centrolobulillar (centrolobulillar).

En cuanto a la distribución, los términos que normalmente se usan son: focal, para referirse a una lesión en una área en concreto;

multifocal, si afecta a más de un foco; y difusa, si la lesión se encuentra en la mayoría de la muestra analizada. Algunos patólogos incluyen el término focalmente extensa para describir una lesión que afecta a una porción grande de la muestra pero aún localizada.

Cuando el término usado para describir la lesión es muy amplio, pueden utilizarse modificadores que restringen su significado para describir el tipo de cambio. Por ejemplo, la *degeneración vacuolar* puede ser producida por distintos tipos de sustancias que aparecen en el citoplasma celular: lípidos, agua o glucógeno. Para reconocerlas y concretar, en ocasiones es necesario utilizar tinciones especiales como Sudan o PAS, tal y como ya hemos comentado anteriormente.

Por otro lado, algunas patologías que evolucionan con el tiempo van acompañadas en su descripción de los modificadores *agudo*, *subagudo* o *crónico*. Se utilizan sobre todo en caso de inflamación y se relacionan con el tipo de célula predominante: neutrófilos en las agudas; neutrófilos con mezcla de células mononucleares en las subagudas; y linfocitos, células plasmáticas o macrófagos en las crónicas



Figura 1.- Ejemplo de nomenclatura para diagnosticar una lesión, incluyendo los modificadores (Mann *et al*, 2012).

TIPOS DE LESIONES MÁS COMUNES EN LOS ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICOS

En este apartado, vamos a presentar un resumen-recordatorio de los términos más frecuentes que se utilizan en los informes de anatomía patológica, y que pueden aparecer tanto en enfermedades espontáneas como en las asociadas a un genotipo concreto en los animales modificados genéticamente, o provocadas por un tratamiento en el curso de un experimento. Se recogen en la Tabla 2.

Alteraciones vasculares

La supervivencia de las células depende de la vascularización, de manera que la alteración en la circulación produce una serie de cambios en la homeostasis hídrica que conllevan lesión. Entre los hallazgos encontrados a consecuencia de estas alteraciones

Alteraciones vasculares	
	Edema Congestión Hemorragia Trombosis Embolia Infarto
Acumulaciones intracelulares	
	Lipidosis Glucógeno Pigmentos
Acumulaciones extracelulares	
	Amiloide Sustancia hialina Cristales de colesterol Calcificaciones Metaplasia ósea
Inflamación	
	Aguda Subaguda Crónica Granulomatosa
Muerte celular	
	Apoptosis Necrosis Coagulación Caseosa Licuefacción Grasa enzimática Autofagia Cornificación
Alteraciones del crecimiento	
	Atrofia Hipertrofia Hiperplasia Metaplasia Neoplasia Maligna Benigna

Tabla 2.- Términos utilizados frecuentemente en anatomía patológica.

están: *el edema*, que es el incremento de líquido en el espacio intersticial y en las cavidades; *la congestión pasiva*, con un aumento del volumen de sangre en el interior de los vasos de un tejido; las *hemorragias* (ver Figura 2A), ya con la extravasación de sangre (desde *petequias* si son menores de 2 mm, *púrpura* entre 3-5 mm o *equimosis* entre 1-2 cm); o los *hematomas*, si la sangre ha salido del vaso pero está delimitada por una cápsula conjuntiva. La *trombosis* es la formación de un coágulo de sangre en un vaso al que permanece unido por el endotelio, pudiéndose encontrar en venas, arterias o corazón. Si este coágulo se desprende del vaso

origina una *trombo-embolia*. Una *embolia* es una masa sólida, líquida o gaseosa intravascular que se transporta por la sangre hasta un lugar distante del punto de origen. Cuando un trombo desprendido o un émbolo ocluyen un vaso (normalmente una arteria), tiene lugar una necrosis isquémica del tejido irrigado por ese vaso que se denomina *infarto*. La creación de infartos de miocardio mediante la ligadura de arterias coronarias es un modelo muy utilizado para reproducir la lesión humana (ver Figura 2B).

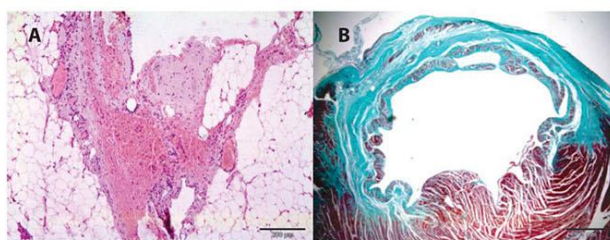


Figura 2.- A: hemorragia focal en peritoneo en cerdo. B: infarto de miocardio severo en corazón de rata.

Acumulaciones intracelulares

En general, se denomina *vacuolización* a los acúmulos de sustancias intracelulares y se añade el modificador específico cuando se conoce su composición, en ocasiones tras la realización de técnicas específicas. Las vacuolizaciones más frecuentes son las *lipidosis* que dan lugar a vacuolas claras, redondeadas y de tamaños variados, y que hay que distinguir de las de *glucógeno* que son más irregulares, menos definidas, que no desplazan al núcleo celular y son PAS positivo. Tanto unas como otras son frecuentes, por ejemplo, en el hígado de roedores (ver Figuras 3A y 3B).

Las *lipidosis* pueden ser de macrovacuolas o microvacuolas. Normalmente aparecen a consecuencia de alteraciones en el balance de lípidos en sangre y la presencia de lipoproteínas, incluyendo entre las causas desde trastornos hepáticos hasta dietas, estados metabólicos y hormonales, o incluso ayuno previo al sacrificio.

Otra acumulación intracelular son los *pigmentos* que pueden ser exógenos, como la tinta que se emplea en ocasiones para el tatuaje, y que aparece en macrófagos de la piel y ganglios locales; o endógenos, como la melanina que además de encontrarse en la epidermis, retina o iris podemos encontrarla en bazo o meninges. La hemosiderina es otro pigmento endógeno de color marrón

amarillento derivado de la hemoglobina que se acumula en el interior de las células cuando hay un exceso de hierro o a consecuencia de una hemorragia.

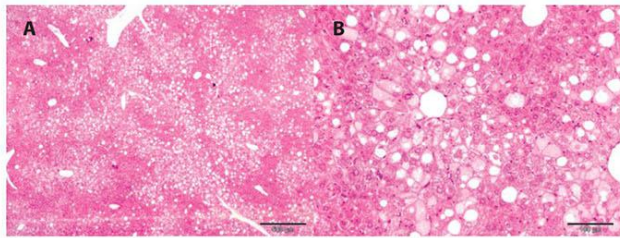


Figura 3.- A y B: degeneración vacuolar lipídica crónica, difusa, severa en hígado de ratón CD1.

Acumulaciones extracelulares

El *amiloide* es una proteína insoluble que aparece como acelular, amorfa y eosinófila en las preparaciones. Se deposita entre las células de diferentes órganos y termina por atrofiarlas. Es frecuente su presencia en el glomérulo renal, lámina propia del intestino o turbinas nasales de ratones, y se asocia a procesos inflamatorios crónicos o neoplasias. La *sustancia hialina* es también de naturaleza proteica, acelular y se tiñe de rosa con la HE (ver Figura 4A). Aparece con frecuencia en los glomérulos renales de los ratones C57BL/6 impidiendo su normal funcionamiento.

La presencia de *cristales de colesterol* se identifica por la aparición de espacios claros con forma de agujas cristalinas en zonas de inflamación, hemorragia o necrosis (ver Figura 4B).

La *calcificación* ocurre en diferentes patologías, con un depósito anómalo de sales de calcio y otros minerales. La *calcificación distrófica* se asocia a zonas de necrosis y se caracteriza por depósitos granulares intensamente basófilos que en ocasiones terminan formando láminas. La *calcificación metastásica* se produce en casos de hipercalcemia por hiperparatiroidismo, enfermedades genéticas o neoplasias que cursan con destrucción de hueso, fallo renal o hipervitaminosis D. Aunque pueden aparecer en cualquier parte del cuerpo, son más frecuentes a nivel del aparato digestivo, riñón, pulmones y corazón.

La *metaplasia ósea* es la presencia de hueso inmaduro en cualquier parte del cuerpo. Su origen es desconocido aunque se asocia a isquemia, hematomas, inflamación crónica y cambios degenerativos.

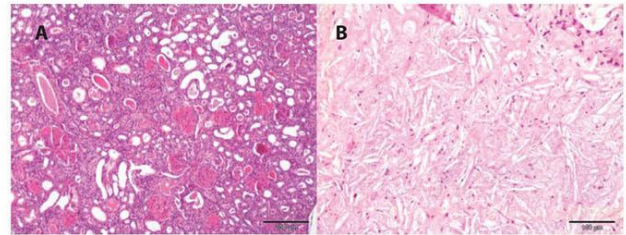


Figura 4.- A: glomerulosclerosis en riñón de ratón CD1 con acúmulo de sustancia hialina, crónica, difusa y severa. **B:** presencia de cristales de colesterol en una zona de necrosis tumoral.

Inflamación / infiltrado inflamatorio

La inflamación es una respuesta protectora del organismo destinada a eliminar la causa inicial de la lesión, aunque puede provocar daño histológico por sí misma.

Como hemos comentado anteriormente, se emplea el diagnóstico de *inflamación* (como neumonía, hepatitis, etc.) para describir un conjunto de cambios en el órgano con una patogénesis, pérdida de funcionalidad y otras alteraciones clínicas ya establecidas. Sin embargo, en estudios descriptivos de toxicología se usa el término de infiltrado celular, acompañado de otros cambios como pueden ser congestión, edema o marginación leucocitaria en caso de procesos agudos, o tejido de granulación/fibrosis en caso de los crónicos. El *infiltrado celular* se acompaña de los modificadores agudo, subagudo o crónico en función del tipo celular (ver Figuras 5A, 5B y 5C).

Muchas patologías que afectan a animales de experimentación cursan con inflamación, incluyendo microorganismos, toxinas, acciones mecánicas o reacciones inmunitarias.

Tras la inflamación tiene lugar la reparación que puede ser: *regeneración* del tejido, es decir la restauración de los tejidos a su situación inicial; o la *cicatrización*, con la sustitución del tejido original por uno conjuntivo (ver Figura 5D). En ocasiones los dos procesos conviven en la misma lesión.

Necrosis/muerte celular

Aunque desde el punto de vista bioquímico se podrían distinguir hasta 13 tipos de muerte celular, desde el punto de vista morfológico se describen cuatro tipos: apoptosis, necrosis, autofagia (rara en células *in vivo*) y cornificación (sólo para

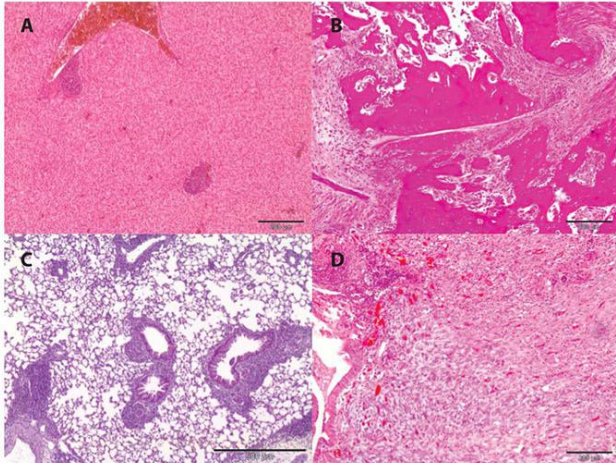


Figura 5.- A: hígado con inflamación granulomatosa, crónica multifocal, moderada en ratón C57BL/6. B: artritis en un modelo inducida con coadyuvante de Freud, crónica, difusa y severa en ratón CBA. C: bronconeumonía aguda multifocal, moderada en ratón C57BL/6. D: cicatrización con tejido conjuntivo en perro.

epitelios estratificados), cada una de ellas con unas características morfológicas específicas. Con hematoxilina-eosina, en ocasiones, se puede distinguir apoptosis de necrosis, o se pueden utilizar técnicas de inmunohistoquímica como el TUNEL o anti-caspasas para identificar las células en apoptosis. Sin embargo, en muchos procesos, sobre todo en toxicología, aparecen secuencial o simultáneamente, dependiendo del tiempo o de la intensidad de la acción del agente causante y en ese caso, su identificación en el microscopio es complicada. Por otro lado, un bajo grado de apoptosis puede ser indistinguible con hematoxilina-eosina.

En la *apoptosis* (ver Figura 6A), las células presentan picnosis (condensación de la cromatina nuclear) y cariorrexis con fragmentación del núcleo y formación de burbujas en las células con rotura en pequeños trozos (cuerpos apoptóticos). Puede aparecer de forma espontánea, por ejemplo para regular el sistema inmunitario o eliminar mutaciones, o inducida por agentes externos como virus, tóxicos, radiaciones, etc.

La *necrosis* se caracteriza por un aumento de volumen de las células (oncosis), que provoca la ruptura de la membrana plasmática, un hinchamiento de las organelas y una condensación moderada de la cromatina nuclear (ver Figura 6B). Existen varios tipos: *necrosis coagulativa*, causada por la falta de oxígeno y consecuente coagulación de las proteínas celulares, como ocurre en los infartos de miocardio o nefrosis tóxica renal; *la necrosis licuefactiva* característica de infecciones bacterianas y

tóxicas en la que predomina la acción de las enzimas; *la necrosis caseosa*, prácticamente exclusiva de enfermedades como la tuberculosis o pseudotuberculosis; y *la necrosis grasa enzimática*, asociada a procesos de pancreatitis.

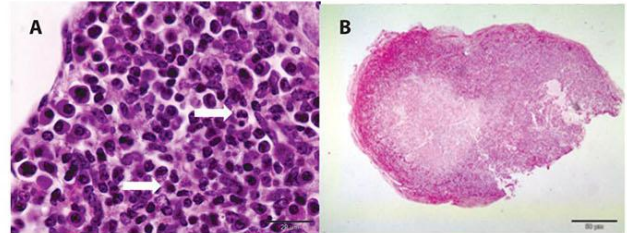


Figura 6.- A: apoptosis en las células de un linfoma en ratón C57BL/6 (flechas). B: necrosis central en un tumor implantado en un ratón NOD scid gamma.

Alteraciones del crecimiento celular

La reducción del tamaño de una célula pero manteniendo su supervivencia se conoce con el nombre de *atrofia*. Dos ejemplos clásicos son: la atrofia uterina en ratas y ratones viejos, consecuencia de la disminución en la producción de hormonas ováricas o tras la administración de ciertos compuestos como la ciclofosfamida; y la atrofia de páncreas exocrino, también en estos animales al envejecer.

Un crecimiento general de un órgano puede ser debido a una *hipertrofia*, que es un aumento del tamaño de las células, o a una *hiperplasia*, que es un aumento en el número de células. Ambas pueden ser patológicas o fisiológicas, y pueden darse al mismo tiempo. Una de las *hipertrofias* más comunes es la de los miocardiocitos (más común en ratón) como respuesta compensatoria a un daño en el corazón, por ejemplo tras un infarto, o a señales a nivel molecular como tratamientos hormonales con esteroides o agonistas β_2 adrenérgicos.

La *hiperplasia* suele estar relacionada con una estimulación excesiva por hormonas o factores de crecimiento que estimulan la mitosis celular. La diferencia con un crecimiento tumoral es que cesa cuando lo hace el estímulo. Un ejemplo es la hiperplasia glandular uterina común en ratas viejas. No hay que confundirla con la *metaplasia*, que es la sustitución reversible de un tipo celular por otro y que constituye un mecanismo de adaptación frente a una agresión, como por ejemplo en las metaplasias escamosas del epitelio respiratorio en caso de inhalación de sustancias irritantes.

En cuanto a las *neoplasias*, tradicionalmente se han definido como crecimientos anormales de las células que continúan después del cese del estímulo. El estudio de la patogenia del cáncer en los animales transgénicos ha permitido reconocer oncogenes asociados a determinados tipos de cáncer.

En general, los tumores no hematopoyéticos aparecen como masas focales que hay que distinguir de abscesos o de quistes. La forma de crecimiento (bien delimitado versus crecimiento infiltrativo), la morfología celular y su comportamiento con la aparición de metástasis a distancia, es lo que diferencia principalmente una neoplasia benigna de una maligna. En los ratones, a diferencia de lo que sucede en otras especies, la gran mayoría de los tumores metastatizan a través de los vasos sanguíneos al pulmón. A continuación, aparecen ya en otros órganos como ganglios linfáticos regionales, hígado, etc. (ver Figura 7A).

Los tumores hematógenos como las leucemias o los linfomas son generalmente difusos y provocan el aumento del tamaño de todo el órgano. En roedores, estos tipos tumorales provocan aumento de ganglios linfáticos, timo, bazo e hígado. En el caso del bazo, hay que diferenciar si el aumento generalizado de su tamaño (esplenomegalia) es debido a un tumor o una infección (ver Figura 7B).

Sin entrar en el caso de los animales transgénicos, entre las distintas cepas y especies existen diferencias en la tendencia a presentar neoplasias. Por ejemplo, en el caso de los ratones, la cepa C57BL/6, BALB/C y CD1 tienen tendencia a presentar linfomas, mientras que la cepa FVB tiene a los adenomas bronquioalveolares, de pituitaria y a los tumores de mama.

CONCLUSIONES

Los estudios de anatomía patológica deben ser realizados por patólogos expertos, que además deben recibir una correcta información del experimento por parte del responsable de los animales. Este último es el primer encargado de las observaciones clínicas, disección y procesamiento de la muestra, mientras que el patólogo es el responsable de interpretar las observaciones del microscopio, poner nombre a la enfermedad y colocarla en su contexto biológico. Lo que los americanos llaman "*shopping for a pathologist*" para obtener un diagnóstico de acuerdo con sus expectativas o el "*do-it-yourself pathology*", sólo lleva a meteduras de pata que, por desgracia, se han dado con frecuencia.

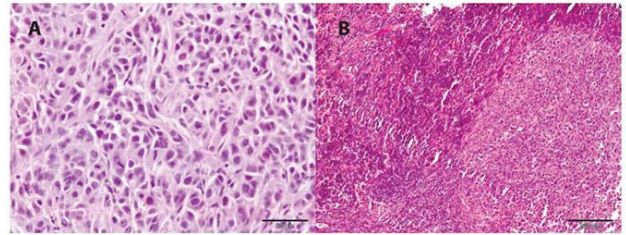


Figura 7.- A: sarcoma indiferenciado con numerosas mitosis en ratón C57BL/6. **B:** linfoma en bazo de ratón.

BIBLIOGRAFÍA

- Cardiff R.D., et al. *Analysis of mouse model pathology: a primer for studying the anatomic pathology and genetically engineered mice*. Cold Spring Harb Protoc 2010, 10:561-80.
- Crissman J., et al. *Best practices guideline: Toxicologic histopathology*. Tox Pathol 2004, 32:126-31.
- Inke T.A., et al. *Do it yourself (DIY) pathology*. Nat Biotechnol 2008, 26:978-9.
- Kroemar G., et al. *Classification of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009*. Cell Death Differ 2009, 16:3-11.
- Kuman V., Cotran S. y Robbins S.L. *Patología Humana*. Elsevier España, 2008 (8ª Ed.).
- Mann P.C., et al. *International harmonization of toxicologic pathology nomenclature: An overview and review of basic principles*. Tox Pathol 2012, 40:75-135.
- Morton D., et al. *Best practices for reporting pathology interpretations within GLP toxicology studies*. Tox Pathol 2006, 34:806-9.
- Percy D.H. and Barthold W. *Pathology of laboratory rodents and rabbits*. Blackwell Publishing, 2007 (3rd Ed).
- Ruehl-Fehlert C., et al. *Revised guides for organ sampling and trimming in rat and mice*. Part 1. Tox Pathol 2003, 55:91-106.
- Thoolen B. *Proliferative and not proliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system*. Tox Pathol 2010, 38:55-81S.
- <http://qoreni.org/>

Patología espontánea en líneas consanguíneas

Alba De Martino

Unidad de Histopatología. Programa de Biotecnología
Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)

INTRODUCCIÓN

Desde principios de la década de 1980, el número de ratones empleados en la generación de modelos genéticamente modificados se ha incrementado exponencialmente a medida que ocurría la traslación de estos modelos a las enfermedades humanas. Las cepas consanguíneas de ratones que contribuyen a la mayoría de estos modelos mantienen un número relativamente grande de patologías espontáneas significativas, a pesar de los ambientes controlados en los que se mantienen.

Al evaluar a los animales, algunas de las diferencias anatómicas que podemos observar en los tejidos o en los órganos son naturales y están asociadas al dimorfismo sexual. Un ejemplo típico sería la presencia de epitelio cúbico en la cápsula glomerular renal en los machos, que es una característica sexual secundaria asociada a la presencia de testosterona. Aunque no son los únicos, otros ejemplos a tener en cuenta son el menor tamaño de adrenales, la presencia de "Zona X" en la médula adrenal, el mayor tamaño y producción de gránulos de zimógeno en glándulas salivares que se observa en machos, o la "masculinización" de glándulas submandibulares, que se da en hembras durante los periodos de gestación y lactancia.

Los factores ambientales, como las interacciones sociales, también afectan al fenotipo. Destacan aspectos tan sutiles como la edad de la madre, la posición de los fetos en el útero, factores de estrés fetal, así como la densidad de población durante y después de la gestación. Es importante identificar e interpretar la presencia de cualquiera de estos cambios con precisión y apropiadamente en el contexto del fenotipado histopatológico, eligiendo los controles adecuados para cada estudio, que idealmente suelen incluir hermanos de camada de distinto genotipo al estudiado o animales no tratados.

PATOLOGÍAS ESPONTÁNEAS NO NEOPLÁSICAS EN LAS LÍNEAS MÁS COMUNES

Entre las condiciones no neoplásicas consideradas como causas que contribuyen a la muerte en las sublíneas de 129 se incluyen patologías que afectan a los sistemas respiratorio, digestivo y vascular. Cabe destacar la neumonía eosinofílica, cristalina o por macrófagos acidófilos, que se encuentra hasta en un 87% de los animales y con mayor presentación en hembras. Se trata de la acumulación de material cristalino de color rosa característico (hipereosinofílicos), formando cristales rectangulares o en forma de pequeñas agujas, tanto en el citoplasma de macrófagos pulmonares, como libres en alvéolos y vías aéreas. La presencia de este material en otros órganos se denomina hialinosis y se ha descrito en mucosa nasal, estómago glandular, vesícula biliar y médula ósea. Puede producir muerte prematura no asociada al desarrollo experimental y se observa frecuentemente asociada a otras patologías pulmonares inducidas, causando confusión en la causa de muerte y en la interpretación de lesiones. La sobreexpresión de proteínas análogas a quitinasas (CLPs; *chitinase-like proteins*), especialmente Chi3L3/YM1 y Chi3L4/Ym2, son las causantes de esta condición.

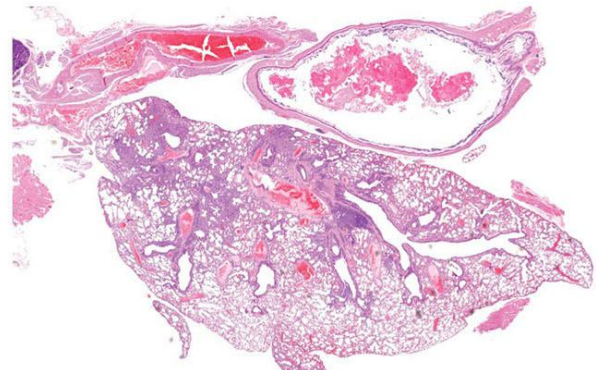


Figura 1.- Megaeosófago con impactación (superior) y neumonía por aspiración secundaria (inferior). Hematoxilina y eosina; 20X.

Además, como causas que contribuyen a la mortalidad en esta línea cabe destacar el megaesófago con impactación (ver Figura 1) y posible neumonía por aspiración secundaria, descrita hasta en el 15% de hembras y el 7% de machos. La inflamación de arterias (arteritis) en múltiples órganos como el bazo, nódulos linfoides, corazón o intestino también puede ser causa de muerte y presenta mayor incidencia en machos (hasta el 7%).

Además de las citadas anteriormente, en esta línea se han descrito multitud de patologías espontáneas que pueden encontrarse de forma esporádica y que no se consideran causas de mortalidad. Se incluyen en este grupo infiltrados inflamatorios linfoplasmocitarios en diversos órganos, cardiomiopatía acompañada o no de mineralización, atrofia ovárica en hembras con o sin hiperplasia quística endometrial, degeneración tubular con o sin mineralización en túbulos seminíferos en machos, hiperplasia glandular en estómago, hiperplasia de islotes de Langerhans en el páncreas, hiperplasia de pituitaria, cataratas y hematopoyesis extramedular en bazo. Entre las patologías neoplásicas espontáneas se podrían citar los adenomas de pulmón (ver Figura 2), que se dan hasta en el 31% de hembras y el 63% de machos, y los teratomas testiculares.

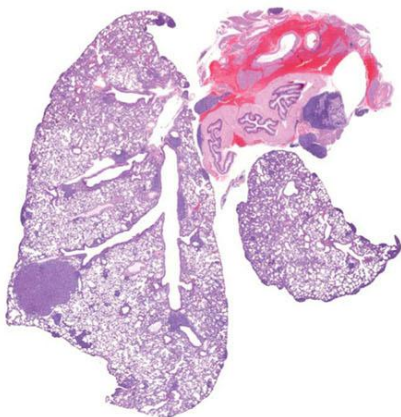


Figura 2.- Adenoma espontáneo de pulmón en lóbulo derecho; Hematoxilina y eosina, 10X.

La línea BALB/c cuenta con patologías propias asociadas entre las que destacan las que afectan al sistema cardiovascular, aparato reproductor y glándulas adrenales. Una de las más frecuentes es la calcificación distrófica cardiaca que se presenta, microscópicamente, como agregados mineralizados azulados bajo el epicardio y cuya incidencia se incrementa con la edad. En la

línea BALB/c, este hallazgo se observa de forma primaria y exclusiva en el epicardio de la pared libre del ventrículo izquierdo. Otras alteraciones cardiacas incluyen la cardiopatía con degeneración miocárdica, necrosis, fibrosis, infiltración inflamatoria y arteritis. Además, se ha descrito la trombosis de aurícula izquierda, con incidencia de hasta el 66% en hembras reproductoras, y poliarteritis similar a la descrita en la especie humana y en otras especies animales.

En esta línea murina también es frecuente la aparición de vagina imperforada asociada a contenido acuoso (hidrómetra) o mucoso (mucómetra) en la luz uterina. Las hembras afectadas son infértiles y desarrollan distensión progresiva del abdomen y región perineal, por el incremento del tamaño del útero llegando a confundirse con gestación. Junto con vagina septada se ha descrito, hasta en el 38% de hembras en algunos estudios, un menor índice reproductivo en comparación con otras cepas.

Mantenidos en condiciones SPF, los ratones de la línea BALB/c pueden desarrollar lipidosis hepática, pólipos uterinos y quistes ováricos, atrofia testicular y mineralización corneal. Las neoplasias más comunes son de tipo hematopoyético con predominio de sarcoma histiocítico (ver Figura 3) y linfoma folicular de células B (hasta un 75% de incidencia), pudiendo ser causa principal de morbilidad o mortalidad en estudios crónicos.

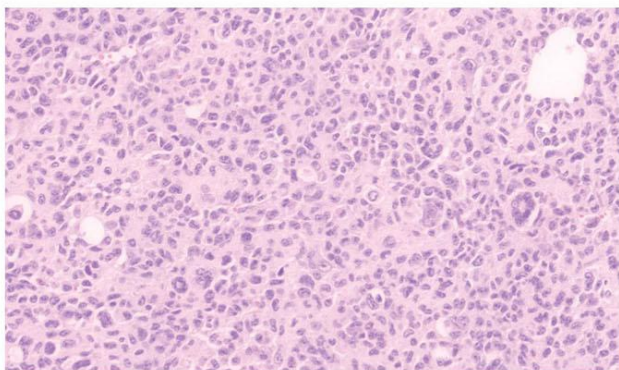


Figura 3.- Sarcoma histiocítico espontáneo en bazo con presencia característica de células gigantes multinucleadas; Hematoxilina y eosina, 400X.

La línea C57BL/6 es una de las mejor descritas debido a la amplia utilización de la misma. Presenta características destacables en varios órganos con mayor incidencia de hidrocefalo que el resto de líneas consanguíneas, microftalmia (y raramente anoftalmia) y presbiacusia, con sordera debida a

degeneración coclear progresiva (C57BL/6 homocigotos para Cdh23ahl). Ocasionalmente presentan malaoclusión. El tamaño del timo es el doble que en el resto de las cepas y su involución más lenta. Por su capa negra, la presencia de melanina es común en distintos tejidos como las meninges, el bazo o las válvulas cardíacas, hallazgo que no debe interpretarse como patológico.

Entre las patologías más comunes que afectan a estos ratones cabe citar la nefropatía con presencia de hidronefrosis y acumulación de cilindros proteicos en túbulos colectores por filtración de proteínas por los glomérulos renales, así como los acúmulos de células inflamatorias (glomerulonefritis) hasta en el 100% de los animales según algunos estudios. En machos, además, se puede producir obstrucción del cuello vesical o uretra proximal con secreciones proteínicas provenientes de las glándulas sexuales accesorias, condición denominada Síndrome Urológico Murino (*Mouse Urologic Syndrome* o *MUS*). En casos agudos puede ser causa de muerte sin sintomatología previa.

En piel y anejos se han descrito alteraciones por el exceso de acicalado (*overgrooming*) y la alopecia inducida (*barbering*), que son comunes a todas las sublíneas relacionadas, así como la dermatitis ulcerativa (MUD; ver Figura 4), que alcanza una incidencia del 20% en algunas colonias y se acompaña de un incremento del tamaño de los nódulos linfoides (linfadenopatía), que en ocasiones pueden confundirse con procesos tumorales.

Dada la amplia utilización de esta cepa, a lo largo del tiempo se han descrito muchas otras patologías compartidas o no con otras cepas. Entre ellas podrían citarse la neumonía eosinofílica o la vagina imperforada, así como las lesiones neurodegenerativas en hipocampo con acúmulo de material granular compatibles con tauopatía, que podrían constituir un modelo para el estudio de enfermedades humanas.

Entre las neoplasias, las más frecuentes son las de tipo hematopoyético. Son habituales los linfomas compatibles con el linfoma folicular de células B, que se caracteriza por el incremento en el tamaño de los órganos afectados antes de los 12 meses de edad siendo el bazo, los nódulos linfoides mesentéricos, el hígado y ocasionalmente las Placas de Peyer (GALT) el origen de estos linfomas. También son frecuentes los sarcomas histiocíticos de origen hepático en machos y uterino en hembras.

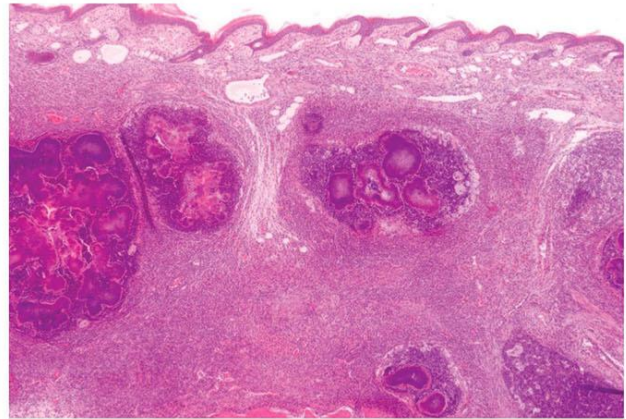


Figura 4.- Dermatitis con infección secundaria en la que se observan múltiples colonias bacterianas en dermis formando agregados característicos. Hematoxilina y eosina; 200X.

Entre las patologías que afectan a la línea FVB destaca, por el cuadro clínico, el síndrome epiléptico letal con presencia de convulsiones espontáneas o inducidas por diversas causas como el tatuaje, *clipping* o los sonidos fuertes como las alarmas de incendios. Afecta en mayor medida a hembras (8:1) y los síntomas incluyen muecas faciales, masticación y ptialismo que progresivamente evoluciona a convulsiones y muerte. En estos casos puede encontrarse necrosis neuronal y astrocitosis en corteza, tálamo e hipocampo, aunque la toma de muestras y fijación de las mismas juega un papel clave a la hora de diferenciar los cambios histológicos reales de artefactos, especialmente en este caso debido a la delicadeza del tejido nervioso. La degeneración temprana de retina debida a la presencia del alelo *Pde6b^{wt}* en homocigosis es otra de las alteraciones espontáneas de la línea que conviene conocer, ya que puede dar lugar a confusión en la interpretación de resultados de distintas pruebas.

Además, la línea FVB presenta, con frecuencia, hiperplasia persistente de glándula mamaria que puede estar asociada a adenoma de parte distal de hipófisis con secreción de prolactina (incidencia hasta un 83% en hembras multíparas y un 52% en nulíparas). Las glándulas presentan un aspecto histológico similar a la gestación o involución tardía, y raramente evolucionan a adenomas o carcinomas. Las neoplasias más frecuentemente encontradas son los tumores de pulmón.

CONCLUSIÓN

El uso de ratones en investigación resulta, con frecuencia, en la necesidad de un diagnóstico, clasificación, interpretación o descubrimiento de nuevos fenotipos y cambios patológicos en diferentes tejidos. Por ello es fundamental conocer las diferencias entre los animales con los que se trabaja, así como las lesiones espontáneas frecuentes en las distintas líneas consanguíneas de uso común, que aparecen como consecuencia del envejecimiento, y de las características propias de la cepa en el curso de los procedimientos. Estas patologías pueden actuar como variables de confusión a la hora de explicar los resultados experimentales, y la interpretación de las mismas sigue siendo un reto debido a la cantidad de variables a tener en cuenta.

BIBLIOGRAFÍA

- Brayton C. *Spontaneous Diseases in Commonly Used Mouse Strains*. In J.G. Fox, S.W. Barthold, et al. (Eds). *The Mouse in Biomedical Research*, 2006. Elsevier (Academic Press): New York, 623-717.
- Ward J.M., et al. *Hyalinosis and Ym1/Ym2 gene expression in the stomach and respiratory tract of 129S4/SvJae and wild-type and CYP1A2-null B6, 129 mice*. *Am J Pathol* 2001, 158(1):323-32.
- Ward J.M., et al. *Pathology of Mice commonly used in Genetic Engineering (C57BL/6; 129; B6; 129; FVB)*. In J.M. Ward, J.F. Mahler, et al. (Eds). *Pathology of Genetically Engineered Mice*, 2002. Iowa State University Press (Blackwell Publishing): Ames, IA., 161-79.
- Blackshear P., et al. *Extragenital teratocarcinoma in chimeric mice*. *Vet Pathol* 1999, 36(5):457-60.
- Korff S., et al. *Fine mapping of Dyscalc1, the major genetic determinant of dystrophic cardiac calcification in mice*. *Physiol Genomics* 2006, 25(3):387-92.
- Ginty I., et al. *Perineal swelling in a mouse. Diagnosis: imperforate vagina with secondary mucometra*. *Lab Anim (NY)* 2008, 37(5):196-9.
- Kim J.S., et al. *Subcapsular cell hyperplasia and mast cell infiltration in the adrenal cortex of mice: comparative study in 7 inbred strains*. *Exp Anim* 1997, 46(4):303-6.
- Bendele A.M. *Urologic syndrome, mouse*. In T.C. Jones, G.C. Hard and U. Mohr (Eds), *Urinary System*, 1998. Springer Verlag: Berlin Heidelberg, 456-62.
- Lacroix-Triki M., et al. *Histiocytic sarcoma in C57BL/6J female mice is associated with liver hematopoiesis: review of 41 cases*. *Toxicol Pathol* 2003, 31(3):304-9.
- Mohr U., et al. (Eds). *Pathobiology of the Aging Mouse*, 1996. ILSI Press: Washington, D.C.
- Mahler J.F., et al. *Spontaneous lesions in aging FVB/N mice*. *Toxicol Pathol* 1996, 24(6):710-6.
- Goelz M.F., et al. *Neuropathologic findings associated with seizures in FVB mice*. *Lab Anim Sci* 1998, 48(1):34-7.
- Kogan S.C., et al. *Bethesda proposals for classification of nonlymphoid hematopoietic neoplasms in mice*. *Blood* 2002, 100(1):238-45.



Técnicas de Diagnóstico en Animales de Laboratorio

Susan Sánchez, BSc, Ms, PhD, FSB

Profesora de Enfermedades Infecciosas, Jefe de las Secciones de Microbiología y Biología Molecular, Athens Veterinary Diagnostic Laboratory, Colegio de Veterinaria, Universidad de Georgia, Athens, Georgia, USA

En un aeropuerto, de camino a una conferencia, mientras contemplaba la página en blanco en mi portátil con bastante ansiedad, debido a la falta de ideas, y la necesidad de escribir en español, cosa que no había hecho desde hacía mucho tiempo, una niña que no debía tener más de cuatro años estaba usando un iPad con facilidad y total soltura. Una actividad muy normal para ella. Desde que tiene memoria, los iPad y los iPhone siempre han existido y siempre los ha usado. Observando a esta niña me doy cuenta cuánto ha cambiado todo gracias a los avances tecnológicos y de cómo un avance favorece que aparezca otro, alimentándose uno a otro. Tranquilos, no se preocupen, este artículo es científico pero veremos cómo se han producido cambios y avances en el cuidado de los animales, especialmente en el tipo de jaulas, en microbiología general, y en particular, en la capacidad para detectar patógenos y anticuerpos. Al final veremos en qué situación están y hacia dónde se dirigen, en un futuro próximo, el diagnóstico y la caracterización de los animales de laboratorio, especialmente en rata y ratón.

A día de hoy es crucial tener esa perspectiva debido a la controversia que hay alrededor de la reproducción y la traslación de la investigación básica en productos para el uso en humanos (Halsey *et al.*, 2015; Kafkafi *et al.*, 2014; Clayton and Collins, 2014; Steckler, 2015).

Utilizamos a los animales como una herramienta adicional en nuestra investigación y como toda herramienta, que se emplea para obtener unas medidas, necesita ser calibrada para eliminar desviaciones que nos permitan reproducir los resultados. Es necesario mantener la genética de las cepas de ratones, la calidad del medio ambiente (niveles altos de amoníaco producen cambios en el epitelio de la tráquea de los ratones; Gamble and Clough, 1976), y eliminar patógenos naturales que causan cambios y alteraciones transitorias o crónicas de los tejidos, o del sistema inmunitario.

Avances en el manejo y el alojamiento

Los animales se han utilizado en investigación desde hace siglos. A partir del siglo veinte los animales más utilizados en experimentación han sido los roedores. Paralelamente al uso de los ratones, ratas y cobayos apareció la necesidad de estandarizar su reproducción y el estado sanitario.

Un grupo de veterinarios interesados en los animales de laboratorio y la creación del panel de Chicago sobre cuidado animal (*Animal Care Panel*, Chicago) fueron cruciales para la diseminación de la información sobre la salud y el cuidado de los animales de laboratorio. En trece años fueron capaces de publicar la primera guía para el cuidado de animales de laboratorio. Esta guía, que se encuentra en su octava edición, aún es la referencia a nivel mundial (<https://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-Care-and-Use-of-Laboratory-Animals.pdf>).

Las cubetas para ratas y ratones, que se usan como alojamiento primario, se han ido modificando para mejorar su producción, acomodar más animales, aumentar la ventilación para disminuir o eliminar olores, facilitar la limpieza y tratar de eliminar o, por lo menos, mantener al margen algunos microorganismos patógenos (ver Figura 1). La evolución en el alojamiento que se inició en los años 50 aún no se ha detenido y ha ido desde las primeras jaulas de madera, pasando por las jaulas metálicas en las que se utilizaron los primeros filtros para eliminar EDIM de la colonia (Kraft, 1958, 1961), las jaulas de plástico con tapaderas metálicas que permiten el acceso a la comida y a la botella de agua, o las tapas de filtro en poliéster de 1975, que evolucionaron a las tapas de plástico modelado por calor del 2001, hasta llegar, finalmente, a las jaulas ventiladas individualmente donde el aire, una vez filtrado, entra directamente en cada jaula y donde los animales tienen acceso directo a agua filtrada. Además, otros avances tales como los

aisladores rígidos o los aisladores de plástico flexibles y la rederivación por cesárea, han permitido la producción de animales libres de bacterias y virus de transmisión horizontal (*germ free*). La ciencia del animal "germ free" avanzó gracias a un hombre brillante, el Dr. Trexler, que falleció recientemente (Trexler and Reynolds, 1957; Trexler, 1961; Tavernor *et al.*, 1971; Trexler, 1977).



Figura 1.- Colección de jaulas para ratones (1940-2000).

Todos estos avances permitieron la producción de roedores que no son solamente idénticos genéticamente, sino que además están libres de un grupo específico de microorganismos que se consideran patogénicos. Actualmente, mantenerlos en ese mismo estado de salud es posible en todos los animalarios donde se hace investigación a alto nivel mediante sistemas de jaulas ventiladas.

Avances Microbiológicos

Mientras tanto, el mundo del diagnóstico en microbiología avanzó a un paso casi tan acelerado en animales como en humanos. Antes de los años 50, la única forma de detectar bacterias era mediante un cultivo y para determinar la presencia de un virus había que cultivarlo. El diagnóstico serológico (detección de anticuerpos en suero) empezó a finales de los 50 y a principios de los sesenta se miniaturizó, lo que permitió su uso en animales pequeños, con los que sólo se podían obtener cantidades pequeñas de suero (0.5 ml), como en el caso de los ratones. Aun así, los ensayos seguían siendo muy complejos y difíciles de estandarizar. Además, en muchos casos aún requerían bastante volumen de suero. En ese momento los ensayos más

usados para diagnóstico, utilizando suero, eran la fijación del complemento y la hemaglutinación indirecta.

En 1975, se usó en diagnóstico el primer anticuerpo monoclonal y en 1974, apareció el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), en el formato de placa con micropocillos (Voller *et al.*, 1974). Aunque fue creado unos años antes, en 1971 (Engvall and Perlmann, 1971), pronto se adaptó para el estudio microbiológico de ratones y ratas con los pocos patógenos virales aislados y cultivados que había en ese momento. En 1977, se introdujeron las primeras laminillas para inmunofluorescencia cubiertas con Teflon® que permitían pocillos múltiples. Estos avances permitieron la creación de programas de diagnóstico para roedores, tanto en universidades o centros de investigación, como en laboratorios privados. En esos casos, siempre aparecía el problema de la calidad de los resultados y la necesidad de que en el resto de laboratorios fuera uniforme ese nivel de calidad. El problema se resolvió en 1985 con la creación de bancos de referencia de sueros para las enfermedades más habituales.

Durante los primeros años, se determinó la prevalencia de los distintos patógenos en las poblaciones, el número mínimo y la edad de los animales que debían ser analizados (Hsu *et al.*, 1980). Se diseñaron protocolos para diagnosticar infecciones en líneas celulares y tumorales que consistían en la inoculación de esas líneas celulares en ratones inmunocompetentes y, posteriormente, esperar 3-4 semanas para que produjeran anticuerpos. Una vez llegado a ese punto, los animales se sacrificaban y se hacía un análisis serológico para detectar anticuerpos frente a virus de ratón, que podían portar esas líneas celulares.

Finalmente, en 1989 (Thigpen *et al.*, 1989) apareció el concepto de los animales centinelas. Este concepto se creó porque era necesario evaluar las cepas de ratones inmunodeficientes. A lo largo del tiempo ha evolucionado y actualmente se usa de forma rutinaria en las unidades con racks ventilados. Estos animales centinelas reciben cama sucia de todas las jaulas de forma sistemática. Cuando se sacrifican, su suero refleja los agentes patógenos que se encuentran en cada una de las jaulas de las que procede la viruta.

Diagnóstico hoy y direcciones en el futuro

La evolución de los racks ventilados en los últimos 10 años ha sido relativamente lenta. Durante esos años se ha incrementado la

oferta de equipos entre las diferentes empresas y se ha mejorado técnicamente, convirtiéndolos en equipos más fiables y resistentes. Los costes de los equipos han disminuido y eso ha hecho que se hayan popularizado y se utilicen en muchas instalaciones (Reeb *et al.*, 1997; Reeb-Whitaker *et al.*, 2001).

En cambio, la evolución de los métodos de detección de patógenos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Sanchez *et al.*, 1994) el inmunoensayo fluorométrico múltiple (MFIA) (Wunderlich *et al.*, 2011) y la capacidad de secuenciar genomas y metagenomas (Turnbaugh *et al.*, 2009) de forma rápida y barata, han transformado el diagnóstico y lo han limitado a laboratorios con capacidad molecular y posibilidad de comprar equipos de coste elevado.

A día de hoy, ya no nos pasamos horas mirando el pelaje de un ratón en busca de *Myocoptes musculinus* u otras especies de ácaros. Simplemente, con un hisopo humedecido, obtenemos una muestra del pelaje de uno o varios ratones y hacemos 90 extracciones de ADN con el robot. De ahí, el robot prepara las mezclas para la PCR y directamente, las noventa extracciones, van a la maquina que hace los ciclos de la PCR y obtenemos los resultados unos minutos más tarde. Esta técnica no es sólo más rápida sino que también mejora la sensibilidad. A cambio, desaparece el placer de observar ácaros a través del microscopio y

la posibilidad de confirmar con total certeza su diagnóstico. Lo mismo sucede con otros diagnósticos que se hacían anteriormente observando preparaciones frescas o flotaciones de intestino delgado. Con otra extracción y otras PCRs tendremos todos los resultados en pocos minutos (ver Figura 2).

Esto también pasa en el campo de la bacteriología, en la que rara vez se hacen cultivos cuando los animales están sanos y sólo se necesita el certificado de "libres de patógenos específicos (SPF)". La PCR de lavados nasofaríngeos es una técnica que se realiza de forma habitual cuando se busca *Mycoplasma pulmonis* y *Pasteurella pneumotropica*.

Todos estos avances son fantásticos, rápidos y de alta sensibilidad, pero los biólogos moleculares no son parasitólogos o bacteriólogos tradicionales. La falta de conocimiento tradicional de los técnicos limita la habilidad de detectar nuevos patógenos o infecciones naturales debidas a bacterias comensales, o que aparecen después de cirugías, peleas, etc., incluso patógenos importados (Ritter *et al.*, 2013).

La MFIA nos ha permitido usar cantidades pequeñas de suero para detectar muchos patógenos en un pocillo de una microplaca (*microtiter plate*). Incluyendo los controles, podemos estudiar 90 sueros por placa y muchas placas al mismo tiempo. Esta técnica es realmente un ELISA en el que el estado sólido no es el pocillo en el plato sino micro-esferas que tienen fluorescencia. Estas esferas vienen en 100 tipos diferentes de fluorescencia y se pueden mezclar en un pocillo para posteriormente identificarse cuando pasan individualmente frente a un láser. Distintos antígenos pueden asociarse con distintas fluorescencias permitiendo un gran número de combinaciones por pocillo. Unos pocos microlitros de suero se mezclan con esferas marcadas con quince o dieciocho antígenos y se detectan fácilmente en aquellos casos en los que el suero tenga anticuerpos frente a esos antígenos. La tecnología de las esferas fue creada y patentada por Luminex® y esta compañía, de momento, solamente le ha concedido la posibilidad de comercializar esferas con antígenos murinos a Charles River (ver Figura 3). El ELISA más tradicional todavía es útil si se tiene suero suficiente. Esta tecnología, en combinación con el avance y conocimiento del genoma viral, antígenos virales que producen respuestas humorales, y la habilidad de clonar y crear proteínas sintéticas, ha permitido preparar antígenos específicos y poder detectar virus y bacterias de distintas especies de forma específica. La necesidad de facilitar el transporte de suero y la necesidad de detectar anticuerpos en animales vivos en

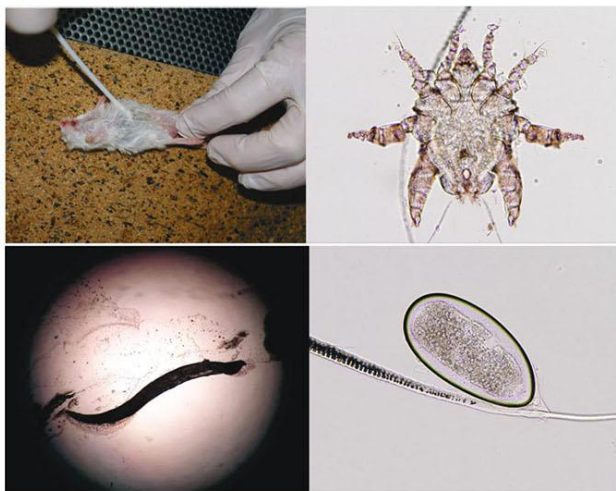


Figura 2.- Tomando muestras del pelaje de un ratón para determinar ácaros por medio de PCR. El mismo ratón después de ser estudiado bajo el microscopio resultó tener ácaros adultos y huevos. La detección de nematodos por PCR es ahora más común que la detección por medio de flotación. La foto de este *Aspicularis muris* fue tomada después de un estudio confirmativo de una PCR positiva en muestra de heces.

Artículos

cuarentena ha traído, recientemente, el uso del papel de filtro como medio de recogida y transporte de sueros. Este medio se utilizó inicialmente para la recogida de sangre en estudios de



Figura 3.- Equipo que permite leer MFI. Esferas fluorescentes miradas bajo el microscopio en un hematocítómetro para poder calcular el número antes de cubrir las con antígeno.

infecciones por malaria y tripanosomas en África. El papel de filtro que usamos para recoger sangre de ratones y ratas ya no es el mismo que se usa para filtrar y eliminar el sedimento de una suspensión, sino que está diseñado para fijar, sin dañar, proteínas, anticuerpos y en otros casos ácidos nucleicos (ver Figura 4).

Los avances en biología molecular, acompañados de los avances en la tecnología de las “micro-esferas” como base sólida para llevar a cabo pruebas serológicas, han permitido el ahorro de costes al requerir menos mano de obra. Estos ahorros sólo se materializan si se analizan un número grande de sueros o animales.

Los estudiantes de veterinaria actuales, con los que me relaciono habitualmente, siempre utilizan la determinación molecular con PCR para diagnosticar y para ellos, el realizar un aislamiento de un virus les resulta algo anormal: ¿por qué no utilizamos las técnicas moleculares y como no sabemos qué virus es, no lo secuenciamos para detectar el “viroma” y así mirar todo lo que hay?, porque al fin y al cabo ¿no se han secuenciado ya todos los genomas de todos los patógenos de animales? Y ya que estamos, ¿cuál es la aplicación que me analizará los resultados?



Figura 4.- Papel de filtro impregnado con sangre de ratón para serología. Esta cantidad de sangre permite hacer un panel serológico completo de ratón.

Sí, los avances en la tecnología han sido mayores en los últimos años y como la niña jugando con el iPad en el aeropuerto, el poder obtener toda esta información no solamente es fácil sino que también es normal, ¿es cosa de niños!

Pero debemos dejar a un lado el chiste y ponernos serios frente al próximo avance en animales de laboratorio que va a tener lugar a nivel de la microbiota bacteriana presente en las distintas cepas. Se está demostrando que, dependiendo de la composición de la flora bacteriana, la misma cepa de ratón actúa de forma distinta en un modelo de laberinto en los estudios psicológicos (Cryan and O'Mahony, 2011), o permanecen delgados cuando se les suministran dietas hipercalóricas (Kallus and Brandt, 2012; Ridaura *et al.*, 2013), y que los resultados de un estudio inmunológico pueden variar dependiendo de la dieta y el animalario donde se llevaron a cabo esos estudios (Trompette *et al.*, 2014; Russell *et al.*, 2015). La flora bacteriana influye en el huésped de diferentes formas que aún no entendemos completamente, pero está claro que influye. La habilidad de controlar y determinar la flora bacteriana de los roedores de laboratorio va a ser la nueva frontera que tendremos que explorar. Cuando pensábamos que ya lo sabíamos todo.... siempre hay más preguntas, por eso elegimos la ciencia como carrera.

BIBLIOGRAFÍA

- Clayton J.A. and Collins F.S. *NIH to balance sex in cell and animal studies*. Nature 2014, 509(7500):282-3.
- Cryan J.F. and O'Mahony S. *The microbiome-gut-brain axis: from bowel to behaviour*. Neurogastroenterology & Motility 2011, 23(3):187-92.
- Engvall E. and Perlmann P. *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G*. Immunochemistry 1971, 8(9):871-4. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0019-2791\(71\)90454-X](http://dx.doi.org/10.1016/0019-2791(71)90454-X).
- Gamble M. and Clough G. *Ammonia build-up in animal boxes and its effect on rat tracheal epithelium*. Laboratory Animals 1976, 10(2):93-104.
- Halsey L.G., Curran-Everett D., Vowler S.L., *et al.* *The fickle P value generates irreproducible results*. Nat Meth 2015, 12(3):179-85. doi:10.1038/nmeth.3288.
- Hsu C., New A., and Mayo J. *Quality assurance of rodent models*. In A. Spiegel, S. Erichsen, HA Solleveld (Eds): *Animal quality and models in biomedical research: 7th symposium of the International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS), Utrecht, August 1979*. Stuttgart, Gustav Fischer.
- Kafkafi N., Lahav T., and Benjamini Y. *What's always wrong with my mouse? Measuring Behavior 2014: The replicability of Measuring Behavior*.
- Kallus S.J. and Brandt L.J. *The intestinal microbiota and obesity*. Journal of Clinical Gastroenterology 2012, 46(1):16-24
- Kraft L.M. *Observations on the control and natural history of epidemic diarrhea of infant mice (EDIM)*. The Yale Journal of Biology and Medicine 1958, 31(3):121.
- Kraft L.M. *Responses of the mouse to the virus of epidemic diarrhea of infant mice. Neutralizing antibodies and carrier state*. Proc Anim Care Panel 1961, 11:125-36.
- Reeb C.K., Jones R.B., Beary D.W., *et al.* *Impact of room ventilation rates on mouse cage ventilation and microenvironment*. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science 1997, 36(1):74-9
- Reeb-Whitaker C., Paigen B., Beamer W., *et al.* *The impact of reduced frequency of cage changes on the health of mice housed in ventilated cages*. Laboratory Animals 2001, 35(1):58-73
- Ridaura V.K., Faith J.J., Rey F.E., *et al.* *Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice*. Science 2013, 341(6150). doi:10.1126/science.1241214.
- Ritter J., Sanchez S., Jones T., *et al.* *Neurologic melioidosis in an imported pigtail macaque (Macaca nemestrina)*. Veterinary Pathology Online 2013, 50(6):1139-1144.
- Russell S.L., Gold M.J., Reynolds L.A., *et al.* *Perinatal antibiotic-induced shifts in gut microbiota have differential effects on inflammatory lung diseases*. Journal of Allergy and Clinical Immunology 2015, 135(1):100-9.
- Sanchez S., Tyler K., Rozengurt N., *et al.* *Comparison of a PCR-based diagnostic assay for Mycoplasma pulmonis with traditional detection techniques*. Laboratory Animals 1994, 28(3):249-56.
- Steckler T. *Preclinical data reproducibility for R&D-the challenge for neuroscience*. Psychopharmacology 2015, 232(2):317-20. doi:10.1007/s00213-014-3836-3.
- Tavernor W., Trexler P., Vaughan L., *et al.* *The production of gnotobiotic piglets and calves by hysterotomy under general anaesthesia*. Veterinary Record 1971, 88(1):10-4.
- Thigpen J., Lebetkin E., Dawes M., *et al.* *The use of dirty bedding for detection of murine pathogens in sentinel mice*. Laboratory Animal Science 1989, 39(4):324-7.
- Trexler P.C. *The gnotobiotic-review and future*. Biomed Purv. 1961, 1:47-8.
- Trexler P.C. *Isolators*. Google Patents 1977.
- Trexler P.C. and Reynolds L.I. *Flexible film apparatus for the rearing and use of germfree animals*. Applied Microbiology 1957, 5(6):406.
- Trompette A., Gollwitzer E.S., Yadava K., *et al.* *Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis*. Nature Medicine 2014, 20(2):159-66.
- Turnbaugh P.J., Ridaura V.K., Faith J.J., *et al.* *The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice*. Sci Transl Med 2009, 1(6):6ra14.
- Voller A., Bidwell D., Huldt G., *et al.* *A microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay and its application to malaria*. Bulletin of the World Health Organization 1974, 51(2):209-11.
- Wunderlich M.L., Dodge M.E., Dhawan R.K., *et al.* *Multiplexed fluorometric immunoassay testing methodology and troubleshooting*. Journal of Visualized Experiments 2011, JoVE (58). doi:10.3791/3715.

Controles sanitarios en ratón, resultados, centinelas, sesgo cognitivo y Kahneman

Ángel Naranjo Pino

Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC)

"Una valoración imparcial de lo desconocido es la piedra de toque de la racionalidad" (D. Kahneman).

FELASA publicó en 1994 las primeras recomendaciones para la realización de controles sanitarios en ratones y desde entonces, se han ido renovando - 2002 y 2014 (1) - e introduciendo cambios con un único fin: tratar de conocer la calidad microbiológica de los animales con los que se hace la experimentación.

La principal dificultad para tratar de alcanzar este objetivo en los animalarios con ratones es **su número**. No es complejo conocer el estado sanitario de un individuo en un momento dado, más allá del factor económico, pero es más complejo conocer cuál es el estado microbiológico de una población y más aún, de una población con un volumen de 1.000, 10.000, 20.000 ó 50.000 ratones que podemos tener en los animalarios. En esos casos, en los que no podemos evaluar todos los individuos, tratamos de hacerlo de forma poblacional. Un programa de control sanitario de un animalario de ratones está diseñado más desde el punto de vista de un epidemiólogo que desde el punto de vista de un clínico.

"Cuando estás formulando un compromiso que puede tener unas consecuencias en el futuro, es necesario saber si te van a gustar esos resultados, o si te gustaría quedarte como estás ahora" (D. Kahneman)

Cuando nos enfrentamos al diseño de un programa de control sanitario, lo primero es utilizar el sentido común y preguntarnos qué queremos saber. La respuesta habitual es que queremos saber si están presentes una serie de agentes que interfieren con nuestra investigación. Esta afirmación nos lleva a varias preguntas: ¿cuál es nuestra investigación?, ¿cuáles son esos agentes?, ¿cada cuánto tiempo queremos saberlo?, ¿con qué grado de certidumbre?, ¿en todo el animalario igual o depende de las zonas? Un programa de control sanitario estará condicionado por las respuestas a estas preguntas.

Aunque parece la más sencilla, probablemente la última pregunta sea en muchos casos la más compleja de contestar. ¿Tiene nuestro animalario una zona o varias? ¿Qué es una zona o unidad desde el punto de vista microbiológico? Una zona o unidad es un área donde presupongo que los ratones que se alojan en ella tienen la misma flora microbiológica. Es decir, los animales tienen un contacto entre ellos de forma directa o de forma indirecta a través del personal, el material, los sitios de cambio de cubetas, etc. y los agentes que tiene un animal pueden estar presentes en el resto. En los animalarios con un solo pasillo, con una o varias habitaciones con ratones alojados en cubetas normales que comparten el ambiente, el material, los técnicos, etc., es sencillo de entender que todo ello sea una unidad. También en el caso de dos aisladores totalmente independientes, o dos edificios totalmente independientes, resulta sencillo de entender que tengo dos unidades. Pero no resulta tan sencillo en animalarios con varias unidades de racks ventilados diseñados para aislar cada cubeta del resto. ¿Entendemos por unidades cada cubeta del rack, cada rack ventilado, o cada grupo de racks? La respuesta es muy relevante porque de ella dependerá el número de muestras que tenemos que coger, y sobre todo a quién afectará los resultados y las medidas a tomar.

El objetivo del control es obtener al menos un animal positivo a los agentes que estamos testando. Recordemos que la muestra que hemos cogido representa a la población de esa unidad y por lo tanto, si obtenemos un positivo, la población de esa unidad tendremos que considerarla como positiva aunque individualmente haya animales positivos y negativos.

Hasta la aparición de los racks ventilados y el incremento de los animales alterados genéticamente, los programas de control sanitario se basaban en obtener una muestra de animales de la propia población de la unidad que queremos analizar y tratar de encontrar al menos 1 animal positivo. Y surge una nueva pregunta: ¿cuántos animales o muestras hay que analizar? Esta pregunta se contesta habitualmente con: **10 animales**. Este

número se ha utilizado para todo sin tener en cuenta de dónde se obtiene ni los condicionantes que requiere.

El número se obtiene al aplicar la fórmula ILAR (2). Esta fórmula trata de encontrar, con un nivel de confianza del 95%, **al menos 1** animal positivo en una población en la que tratemos de detectar un agente que tenga una prevalencia alrededor del 30%. Ésta era la prevalencia que se estimaba para los agentes más habituales. Esta fórmula sólo es aplicable si el agente se distribuye en toda la población de forma uniforme, si cogemos los 10 animales **al azar**, si el núcleo de animales es de al menos 100 individuos y si se alojan en la **misma unidad microbiológica**.

Las prevalencias de agentes "históricos" como el Virus Ectromelia, *Clostridium piliformis* (*C. piliformis*) o el Virus de la Hepatitis del Ratón (MHV), en sistemas de alojamiento de cubetas sin cobertor, se sabe que son superiores al 30%. Sin embargo, para algunos agentes que se han introducido posteriormente en los controles, como el Parvo Virus de Ratón (MPV) o *Pneumocystis murina* (*P. murina*), se desconocen las prevalencias reales, aunque se sospecha que son inferiores al 25%. Con los sistemas de alojamiento actuales, con cubetas con cobertor y racks ventilados, los agentes no se distribuyen fácilmente, ya que estos mismos sistemas de alojamiento se diseñaron para disminuir las contaminaciones de los animales y por lo tanto, bajan las prevalencias de los agentes. Además muchas estirpes de ratón no tienen las mismas susceptibilidades a agentes infecciosos y, en general, las cepas derivadas de C57BL/6 son más resistentes a infecciones que el resto de cepas consanguíneas.

Por lo tanto, utilizando nuevamente la fórmula ILAR, o alguno de los programas para epidemiología que podemos encontrar en la web (3), si se cumplen todos los condicionantes anteriores y cogemos 2 animales en vez de 10, la probabilidad de obtener al menos 1 animal positivo es del 51%. Si en vez de 2 animales cogemos los 10 animales, pero para analizar un agente con una prevalencia del 10%, la probabilidad será del 65%. Y si tenemos animales alojados en rack ventilado y queremos tener una probabilidad del 95% para obtener al menos 1 animal positivo a MPV, necesitaremos 298 ratones porque la prevalencia puede bajar hasta el 1% (4). Recordemos, esto es por unidad o zona, cogiendo animales o muestras de la población al azar.

Para complicar aún más la situación, en la mayoría de animalarios no es posible coger animales al azar de la población. En unos casos porque los animales están incluidos en un

experimento, en otros casos porque son animales alterados genéticamente, difíciles de conseguir y el investigador no puede desprenderse de ellos, o bien porque sean animales con alteraciones del sistema inmune y, por lo tanto, es imposible que realicemos una prueba de anticuerpos. Es importante señalar que aunque algunos animales no hayan sido identificados como inmunodeficientes por los investigadores, pueden tener alteraciones del sistema inmune que afecten la respuesta por anticuerpos, haciendo que pruebas diseñadas para ratones con respuestas "normales" den resultados falsos.

Estos problemas logísticos propiciaron la estrategia de utilizar centinelas para la realización de los controles sanitarios (5). En la mayoría de las ocasiones, los centinelas son ratones de cepas no consanguíneas, inmunocompetentes, sencillos de conseguir o producir, de un estatus sanitario conocido, que permanecen alojados durante un tiempo en la misma unidad de los animales que se van a analizar. En la mayoría de los sistemas de centinelas, éstos reciben viruta usada de las cubetas de dicha población, con lo que se fuerza el contacto. La utilización del sistema basado en centinelas, al igual que el número mágico de 10, se aplica en los animalarios sin tener en cuenta algunos factores.

El primer factor tiene que ver con los animales. Las infecciones son dependientes de las condiciones del hospedador y los animales inmunocompetentes son muy poco sensibles a algunos agentes que afectan a animales inmunodeficientes, como CAR *Bacillus*, *P. murina*, o *Corynebacterium bovis* (*C. bovis*) (6).

El segundo factor tiene que ver con los agentes. Algunos de los agentes que se analizan no se transmiten a través de las heces, como el Virus Sendai, el virus de la Neumonía del ratón (PVM), *Pasteurella pneumotropica* (*P. pneumotropica*) (4). Otros agentes, como MHV, aunque sí se transmiten a través de las heces, son muy poco resistentes en el medio y requieren de heces frescas y no de viruta con heces antiguas. Los ácaros requieren un contacto cercano entre animales para poder infectar otros individuos. *Citrobacter rodentium* (*C. rodentium*) y algunos protozoos sólo infectan animales jóvenes y no adultos. En el caso de otros agentes, que sí son resistentes en el medio, la excreción es intermitente y dependiente de la edad y de la cepa del ratón, como en el caso de MPV.

El tercer factor tiene que ver con la cantidad de viruta necesaria para infectar a los animales centinelas. Al añadir viruta sucia, estamos diluyendo las heces contaminadas en el volumen

total de viruta, con lo que la probabilidad de contaminación de los animales centinelas disminuye. Dependiendo del agente, se ha descrito que para que se infecten los centinelas es necesario que esté contaminada entre el 20 y el 50% de la viruta de una cubeta (1). En la mayoría de los casos, estos volúmenes se han obtenido en estudios con colonias de ratones en las que prácticamente toda la población estaba contaminada y no en casos en los que unas cubetas estaban contaminadas y otras no.

Dando ese valor del 20-50% por aceptable, si el volumen de viruta de una cubeta de rack ventilado está alrededor de 1.000 cm³ y el volumen de viruta externa que hay que añadir es de alrededor de 500 cm³ (50% del total), ¿de cuántas cubetas podemos transferir viruta sucia a una cubeta de centinelas? De acuerdo a algunas publicaciones, las recomendaciones varían entre 30 y 50 cubetas por cada cubeta de centinelas (1). Es decir, el volumen que se transferirá de cada cubeta a la del centinela estará entorno de 10 y 15 cm³ (30-50 cubetas). Esta cantidad representa el 1-2% del volumen de cada cubeta y la dilución es tan alta que sólo seremos capaces de infectar los centinelas cuando haya un número muy alto de cubetas infectadas dentro de la población. Para complicar aún más la situación, en muchos centros las cubetas se cambian quincenalmente en vez de semanalmente y se aprovecha ese momento para realizar las transferencias de viruta, con lo que el descenso del número de veces que ponemos en contacto viruta "contaminada" y centinelas, también reducirá las posibilidades de contaminación.

Por lo tanto, aunque el número de centinelas por unidad dependa de varios factores, es evidente que uno de ellos tiene que ser el número de cubetas que formen cada unidad. Si no tenemos ese número en cuenta, no les podremos añadir viruta de todas las cubetas a la de los centinelas. Es imposible poner en contacto una unidad de 1.000 cubetas con sólo 2 cubetas de animales centinelas. Por esta razón, en el caso de que el programa de control sanitario se realice con centinelas, el número de cubetas de la unidad por cubeta de centinelas es una de las informaciones que debería acompañar a los informes sanitarios para evaluar el nivel de confianza de los resultados.

La adopción de los sistemas de control sanitario a través de centinelas, que se ha popularizado en los últimos años, se ha debido no sólo a la dificultad para tener acceso a animales de la colonia y a la aparición de los racks ventilados, sino también a la falta de recursos. De alguna forma, se han tomado los centinelas no como individuos de la propia unidad, a los que forzamos a

tener contacto con los individuos de la población transfiriendo viruta y saltando así los sistemas de alojamiento actuales que lo impiden, sino como "detectores mágicos". En vez de 10 animales por unidad, se analizan 2 centinelas y se reducen los costes. ¿Por qué pensamos que esos 2 animales centinelas son una muestra suficiente y son diferentes a los animales de una población en la que los agentes infecciosos están distribuidos?

Existen diferentes programas para el cálculo del tamaño de la muestra necesaria para detectar al menos un animal positivo (3). En todos los casos, el cálculo de la muestra dependerá, como ya hemos comentado en párrafos anteriores, del nivel de confianza que queramos tener, de la prevalencia del agente y también de la sensibilidad y la especificidad de los análisis que utilizamos para el diagnóstico. Cada uno tiene unas características de sensibilidad y especificidad que no debemos ignorar.

Veámoslo con un ejemplo: los resultados de una determinación con una prueba de diagnóstico a una población de 1.000 individuos, en la que el 50% estaban infectados por un agente X, han dado los valores recogidos en la Tabla 1.

Tabla 1

		Infección por el agente X		
		Infectados	No Infectados	
Prueba frente al agente X	Positivos	475 (a)	35(b)	510 (a+b)
	Negativos	25 (c)	465 (d)	490 (c+d)
		500 (a+c)	500 (b+d)	1000 (a+b+c+d)

La sensibilidad (SE) de una prueba mide su capacidad para detectar animales positivos dentro de la población de animales infectados. En este caso, se han detectado 475 positivos de los 500 animales infectados analizados; es decir, la sensibilidad ha sido de un 95% (475/500 = 95; ver Tabla 2). Por otra parte, la especificidad (ES) indica el porcentaje de animales identificados por el análisis como negativos del total de animales no infectados. En nuestro ejemplo, se han detectado como negativos 465 de los 500 no infectados, es decir la especificidad ha sido del 93% (465/500=93%).

Dicho de otro modo, la sensibilidad nos dice que la prueba detectará al 95% de los animales que estén infectados y los dará como positivos, pero también puede dar como positivos animales no infectados. En este caso, la probabilidad de que un animal infectado no de positivo (falso negativo) es muy baja. Exactamente igual en el caso de la especificidad, en el 93% de los casos de animales no infectados la prueba los dará como negativo, pero también puede dar como negativo animales infectados (falsos positivos). En este caso, la probabilidad de que un animal no infectado dé positivo es muy baja.

La sensibilidad y la especificidad nos indican la probabilidad de cometer errores, pero cuando nosotros realizamos los análisis desconocemos qué animales realmente están infectados y cuáles no, y aunque sepamos los valores de sensibilidad y especificidad, lo que necesitamos saber es qué relevancia o fiabilidad tienen los resultados.

Tabla 2

		Infección por el agente X			
		Infectados	No Infectados		
Prueba frente al agente X	Positivos	475 (a)	35(b)	510 (a+b)	VPP=475/510=93. 1%
	Negativos	25 (c)	465 (d)	490 (c+d)	VPN=465/490=94.9%
		500 (a+c) SE: a/(a+c)=95%	500 (b+d) ES: b/(b+d)=93%	1000 (a+b+c+d)	

Volviendo a nuestro ejemplo (ver Tabla 2), la proporción de animales realmente infectados que había entre los que dieron positivo fue de un 93.1% (475/510) y el número de animales no infectados que dieron negativo fue de un 94.9% (465/490). Estos dos valores se conocen como Valor Predictivo del Positivo (VPP) y Valor Predictivo del Negativo (VPN), y nos dicen la probabilidad de que el animal que dé positivo esté realmente infectado y el animal que dé negativo realmente no esté infectado.

El Valor Predictivo Positivo (VPP) y el Valor Predictivo Negativo (VPN) son valores muy importantes cuando realizamos las pruebas de diagnóstico. A diferencia de los valores de sensibilidad y especificidad, que se calculan en los laboratorios y que suelen permanecer constantes, los valores de VPP y de VPN no lo son. Cambian y dependen directamente de las prevalencias de los agentes. En nuestro ejemplo, la infección por el agente X tenía una prevalencia (proporción de infectados de toda la población en un momento dado) del 50% [(a+c)/(a+b+c+d)]. La prueba tenía una sensibilidad del 95% (SE) y un Valor Predictivo del Positivo del 93.1% (VPP).

Veamos ahora un escenario diferente (ver Tabla 3) con una población total de 5.000 individuos en la que nuestro agente X, debido a los sistemas de alojamiento de los animales, ha variado su prevalencia pasando del 50% al 10%. La sensibilidad de la prueba sigue siendo del 95% (SE), al igual que en la población inicial, pero el Valor Predictivo Positivo es ahora del 60.1% (VPP), muy por debajo del 93.1% de la población anterior. Por tanto, el descenso de las prevalencias hace descender el valor predictivo del positivo.

Tabla 3

		Infección por el agente X			
		Infectados	No Infectados		
Prueba frente al agente X	Positivos	475 (a)	315 (b)	790 (a+b)	VPP=a/(a+b)=60.1%
	Negativos	25 (c)	4185 (d)	4210 (c+d)	VPN=d/(c+d)=99.4%
		500 (a+c) SE: a/(a+c)=95%	4500 (b+d) ES: b/(b+d)=93%	5000 (a+b+c+d)	

Incorporemos estos conceptos a una situación real. Una unidad que aloja 1.000 ratones, con un programa de control sanitario basado en la utilización de sólo 2 animales centinelas a los que se trasvasa viruta, y con el que tratamos de detectar al menos un animal infectado por un agente que esperamos que se transmita por las heces, con una prevalencia del 10% (la prevalencia de los agentes transmitidos por la viruta de centinelas baja drásticamente), realizando unas pruebas con una sensibilidad y especificidad del 95%. Si obtenemos un resultado negativo, el nivel de confianza, utilizando la fórmula ILAR (2), estará en torno al 18%. Si obtenemos un resultado positivo, el VPP de una prueba con una sensibilidad del 95% y especificidad del 95% con un agente de una prevalencia del 10% será del 67.8%. Por esta razón, tanto los resultados positivos como los negativos obtenidos utilizando un programa como el descrito anteriormente pueden no reflejar el estado sanitario de la colonia y ofrecer un nivel de confianza muy bajo.

“A menudo no somos conscientes de la poca información que tenemos, y si no somos conscientes de esto, entonces tenemos el fenómeno del exceso de confianza. La confianza no es un juicio, es un sentimiento” (D. Kahneman)

En el programa de control sanitario se determina también cada cuanto tiempo queremos tener resultados. En la mayoría de las ocasiones, dependerá del riesgo de contaminación de la instalación y de la relevancia de la interferencia de los agentes que se analicen con los resultados experimentales. La mayoría de los

animalarios cuentan con instalaciones mínimas que aíslan a los animales del exterior y el principal factor de riesgo a tener en cuenta son otros ratones o muestras biológicas. Si hay entradas frecuentes de ratones externos o muestras biológicas, el riesgo de introducir agentes no deseados se multiplica. La forma más eficiente de infectar ratones es con **otros ratones o con muestras biológicas**. En general, ponemos mucho énfasis en barreras poco relevantes y sin embargo, prestamos menos atención al control de los ratones o de las muestras que introducimos en nuestro animalario. Aunque los informes sanitarios que los acompañen pueden darnos una visión de la colonia, esa visión, como hemos visto, puede no ser real a nivel individual.

Las recomendaciones de FELASA establecen programas con controles cada 3 meses para aquellos agentes con mayor incidencia en los últimos años, cada 12 meses para otros agentes con una baja incidencia y para un tercer grupo de agentes, lo fija dependiendo de las necesidades de cada instalación. Esta cadencia representa un consenso del tiempo necesario para que en el caso de que entre un agente en una instalación, éste se distribuya por los animales y seamos capaces de detectarlo con animales de la colonia tomados al azar o por animales centinelas. Por lo tanto, un resultado positivo en un control sanitario rutinario puede no dar una imagen inicial de la infección sino, más bien, una consolidación del agente en la colonia. Por el mismo razonamiento, para descartar que un agente se ha eliminado de la colonia, dependiendo del programa, puede que no sea suficiente con sólo un resultado negativo inmediato, sino que tendremos que esperar un periodo de tiempo que nos permita confirmar que el agente se ha eliminado realmente. La mayoría de los tratamientos frente a nematodos eliminan los parásitos adultos y las formas larvianas, pero no las formas de resistencia que, pasado un tiempo, reinfectan a unos pocos animales. Esto provoca que durante varios periodos, los controles sanitarios den resultados negativos y cuando ya se han infectado un número alto de cubetas vuelvan a aparecer resultados positivos.

En instalaciones en las que no se reciben animales de fuera ni muestras biológicas sin analizar durante los experimentos porque tienen sistemas de todo dentro-todo fuera, se pueden establecer programas en los que se realicen controles al inicio y al final del experimento. Pero en aquellas instalaciones en las que se reciban animales externos frecuentemente, será necesario incrementar la frecuencia de los controles o establecer sistemas de transferencia de embriones para introducir a los animales.

Aunque las recomendaciones de FELASA hacen distinciones de frecuencia de los controles entre diferentes grupos de agentes, en la actualidad, los laboratorios de diagnóstico han desarrollado técnicas que permiten analizar muchos agentes en una o pocas pruebas. Para los animalarios, la diferencia de coste entre determinar un agente o un grupo amplio es muy reducida. Igualmente se pueden chequear varios animales en la misma prueba usando muestras agrupadas (*pool* de muestras). La tentación de reducir costes agrupando muestras de un número amplio de animales debe de ponderarse teniendo en cuenta los umbrales de detección de cada prueba. Los laboratorios de diagnóstico validan sus análisis para unos niveles de corte de concentración de anticuerpos en suero. En otras palabras, si hacemos diluciones que sobrepasen estas concentraciones nos darán como resultado falsos negativos. Igualmente, las pruebas de PCR son capaces de detectar un número mínimo de copias en las muestras, pero ese número mínimo puede ser diferente dependiendo de los agentes, de los análisis y de los laboratorios.

Aunque las pruebas desarrolladas en los laboratorios son cada vez más específicas sin perder sensibilidad, siempre existe la posibilidad de tener resultados falsos positivos que lleven a tomar medidas prematuras. Como norma general, en caso de un positivo debemos volver a analizar la muestra con la misma técnica y en caso de confirmarse el resultado, debe de repetirse el análisis con otra técnica, a ser posible de una especificidad mayor y aplicar una lógica Bayesiana. La probabilidad conjunta de que dos técnicas, en las que la segunda tenga una especificidad alta, den positivas sube el valor predictivo del positivo (VPP). Aun así, para confirmarlo, se debe analizar un número alto de animales que hayan estado en contacto con el animal que ha dado positivo, porque en algunas ocasiones tenemos falsos positivos por contaminaciones de las muestras.

Conforme se han ido describiendo agentes que interaccionaban con resultados experimentales en modelos de ratones, sobre todo en ratones alterados genéticamente, éstos se han ido añadiendo al listado de agentes a controlar con una filosofía de prevención. En algunos casos, se han incluido agentes como el Norovirus Murino (MNV) que sólo afecta a unas pocas estirpes de ratón, como los KO del gen STAT1, con una deficiencia concreta en inmunidad innata. En otros casos, se analizan bacterias y hongos que son ubicuos, como *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella spp.* o *P. murina*, que en muchos casos dan resultados negativos en las pruebas que se utilizan de rutina y sólo tienen relevancia cuando aparecen en casos clínicos. Incluso se han

incluido agentes para los que nunca se han descrito interacciones con la investigación, como *Trichomomas spp.* o *Entamoeba muris* y, en cambio, otros que sí han demostrado ser patógenos, como *C. bovis* en ratones desnudos, no se incluyen. Con el aumento de la identificación de la microbiota de los ratones, aparecen periódicamente nuevos candidatos de agentes a controlar, como las Bacterias Filamentosas Segmentadas (SFB) que, aun formando parte de la flora intestinal de los ratones, ya se plantea su posible interferencia con la investigación en algunos artículos (6).

Actualmente la barrera entre qué agentes son “buenos” y qué agentes son “malos” es demasiado gruesa. Para la mayoría de los animalarios, cualquier agente es considerado “malo”. No tanto por su interferencia con la investigación sino más bien por no tener problemas de rechazo debidos a los resultados del control sanitario en el intercambio de animales. Esto conlleva un doble gasto: los recursos para controlar múltiples agentes y los necesarios para mantener múltiples barreras, cuestionables en algunos casos, que impidan el paso de estos agentes.

Muchos investigadores se plantean si los resultados de los experimentos con ese tipo de animales, en los que se han eliminado agentes que formaban parte de su flora y mantenían un equilibrio con el hospedador, son reproducibles en otros centros.

A pesar de los inconvenientes descritos, los informes sanitarios nos dan una aproximación a la situación microbiológica de los animales que utilizamos en experimentación. Dichos informes no deberían ser simplemente un listado con unos resultados sobre unos agentes que nos remite un laboratorio de diagnóstico. Con esos datos, una persona externa que evalúa ese informe y que desconoce el sitio de alojamiento y las unidades microbiológicas, el número de muestras enviadas de dicha unidad, los resultados anteriores, si son centinelas o animales de la unidad, etc. no puede hacerse una idea de cuál es el estado microbiológico real de los animales.

Los informes sanitarios deberían incluir el programa de control sanitario y reflejar las recomendaciones de FELASA en referencia al formato en el que se describen las unidades, los resultados, las pruebas, los laboratorios y los resultados históricos.

Todos los esfuerzos que se llevan a cabo tratando de mejorar la calidad de los experimentos y conocer mejor la flora microbiológica que acompaña a los animales van también en esa dirección. Quizás la línea entre qué agentes son aceptables y

cuáles no debería ser más fina. Es imposible controlar todas las interacciones entre los individuos y los microorganismos que les rodean, y definir cuáles son esos microorganismos no implica eliminarlos de su entorno.

Como hemos visto, en las colonias de ratones en las que no se pueden analizar todos los individuos sino una muestra representativa, conocer el estado sanitario de la colonia es un proceso complejo que no se puede resolver con soluciones sencillas que incluyan “sólo” realizar unas determinadas pruebas a unos pocos animales centinelas.

El programa de control sanitario se vería enriquecido si incluyéramos a los resultados, las pruebas y necropsias realizadas a animales que se vayan a eliminar de la colonia, los de aquellos animales que muestren signos clínicos y los de los controles medioambientales en filtros de racks, etc. Los responsables en salud deben ampliar los enfoques a la hora de planificar los controles sanitarios, deben conocer cuáles son las patologías espontáneas en ratones para diferenciarlas de las causadas por agentes infecciosos y deben tener en cuenta que periódicamente aparecen nuevos agentes que debemos detectar para definir la flora microbiológica de los animales.

“Nuestra convicción placentera de que el mundo tiene lógica se basa en un principio seguro: nuestra casi ilimitada habilidad para ignorar nuestra ignorancia” (D. Kahneman; 8)

BIBLIOGRAFÍA

1. Mähler M., Berard M., Feinstein R., et al. *FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units*. Lab Anim 2014, 48(3):178-92
2. Lindsey J.R., Boorman G.A., Collins M.J.Jr., et al. *Infectious Diseases of Mice and Rats*. Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council Washington: National Academy Press 1991.
3. <http://www.winepi.net/f101.php>
4. Fox J.G., Barthold S.W., Davisson M.T., et al. *The Mouse in Biomedical Research: Diseases* (2nd Ed, vol II). San Diego: Academic Press/Elsevier 2007.
5. Thigpen J.E., Lebetkin E.H., Dawes M.L., et al. *The use of dirty bedding for detection of murine pathogens in sentinel mice*. Lab Anim Sci 1989, 39(4):324-7.
6. Percy D.H. and Barthold S.W. *Pathology of Laboratory Rodents and Rabbits* (3rd Ed). Ames: Blackwell Publishing 2007.
7. Ericsson A.C., Hagan C.E., Davis D.J., et al. *Segmented Filamentous Bacteria: Commensal Microbes with Potential Effects on Research*. Comp Med 2014, 64(2):90-8.
8. <http://www.princeton.edu/~kahneman/docs/DKahnemanCV.pdf>



Los inicios de SECAL con Carmina Fernández Criado, Javier Palacín y Jordi Cantó



Un grupo de colaboradores de la revista **Animales de Laboratorio** (Marta Giral, Lola García Olmo, María Granada Picazo y Lara Sedó) se reúne con Carmina Fernández Criado, Javier Palacín y Jordi Cantó (socios número 2, 5 y 6 de la SECAL, respectivamente), que han tenido la amabilidad de quedarse un rato a charlar, recién terminada la VI Jornada de la SECAL, celebrada en Barcelona.

Aunque ellos se definen –entre risas– como “la tercera edad”, en realidad estamos a punto de escuchar a la memoria viva de la SECAL, tan entusiasta y activa como hace 25 años.

Animales de Laboratorio (ADL): Recordadnos qué pasó hace 25 años. ¿De dónde partimos? ¿Cómo fue todo?

Carmina Fernández Criado (CFC): Cuando yo empecé a trabajar, por el año 1975 o 1976, los profesionales del animal de laboratorio estábamos absolutamente solos. No nos conocíamos entre nosotros, no sabíamos nada, no habíamos recibido

formación en la carrera. Y llegamos a un puesto de trabajo sin conocimientos de ningún tipo. La primera gente a la que yo conocí fue en Barcelona, en los cursos que organizaba el CIPCAL, sobre “rata y ratón”.

Jordi Cantó (JC): Sí, aquí [en Barcelona] habíamos hecho una especie de SECAL, con la mínima inversión de energía y de dinero, y queríamos que fuera algo muy ágil. Habíamos detectado que había una serie de responsables de animalarios y de investigadores interesados en el tema en distintos ámbitos, y lo que queríamos era poder empezar a trabajar aun sin tener dinero, ni sede social ni estatutos. Constituimos lo que se llamó oficialmente el CIPCAL (Comité Interasociativo Promotor de las Ciencias del Animal de Laboratorio). Tuvimos muchas sesiones previas internas y, cuando vimos que todos hacíamos mucho pero nadie sabía nada, dijimos: hay que ponerse manos a la obra. Y como la mejor manera de aprender es enseñando, empezamos a organizar estos cursos a los que aludía antes Carmina. Iban dirigidos en principio al ámbito de Cataluña, en donde había ya

mucha gente interesada, pero finalmente se hicieron extensivos a otra gente, y de ahí surgió la conexión.

Javier Palacín (JP): Los que estaban mejor organizados eran los de Barcelona porque la industria farmacéutica, la química y la alimentaria eran mucho más fuertes e integraba más la inquietud sobre el animal de laboratorio. El germen del animal de laboratorio estaba ahí; en Madrid estábamos muy descoordinados.

CFC: En los cursos de Barcelona fue donde nos conocimos los de Madrid, que íbamos cada uno por su lado. A raíz de eso, empezamos a reunirnos en el Colegio de Biólogos de Madrid para contarnos los problemas que teníamos ¡Y es que no teníamos ni idea de animales de laboratorio!

JC: En definitiva, cuatro aficionados con problemas que íbamos a llorar juntos y a ver cómo avanzábamos... Esto fue el inicio.

ADL: Y a raíz de todo eso, se decidió formar una asociación...

CFC: Sí, pronto nos planteamos la posibilidad de constituir una sociedad. Desde Madrid, mandamos información a gente de otras CC.AA. y organizamos una reunión en el CSIC, en Serrano, a la que asistimos unas 100 personas. Había mucha gente a la que no conocíamos. Sin embargo, los cursos del CIPCAL fueron por los años 77 y 78 y las primeras reuniones para constituir la SECAL debieron ser por el 83-84... Pasaron muchos años todavía entre una cosa y otra.

El grupo de Madrid lo lideraba Carlos Bellver, que fue el que escribió a mano los primeros estatutos. ¡Recuerdo que los tuve que pasar al ordenador y ni siquiera sabía cómo encenderlo! Así que empezamos a constituir la SECAL y tuvimos que poner 1.000 pesetas cada uno, porque no teníamos ni para sellos. Teníamos que imprimir toda la documentación y difundirla para darnos a conocer. Cuando organizamos el primer congreso, la cuota la pusimos a 5.000 pesetas.

En el año 1989 se constituyó la SECAL oficialmente. El padre de Javier, que se acababa de jubilar y era el único que tenía tiempo, fue a hacer los trámites del NIF. Cada uno se encargaba de una cosa.

Yo, por ejemplo, hice la primera base de datos con un bedel que sabía un poquito de informática, y la teníamos en un disco blando. ¡Me salió toda con minúsculas! Luego empezó a meterse gente que sabía ya un poquito, y se hizo la primera revista de la SECAL, a la que llamamos el "NO-DO". Jordi se encargaba de hacer el listado de lo que publicaban las revistas internacionales.

Ah, y hablando de otras cosas: el logo de la SECAL. Del logo se encargó Pablo Jorge, del Hospital Ramón y Cajal, y lo hizo un delineante del Hospital. ¡No sabemos ni su nombre! De repente vino un día con el logo, "el logo de la SECAL".

Cuando lo vimos, no dudamos en quedárnoslo. Incluso nos felicitaron las sociedades europeas. A mediados de los 90 se quiso cambiar, pero la propuesta no prosperó.

ADL: Y al poco de constituirse la sociedad, ya se organizó el primer congreso. Debió de ser todo un reto...

CFC: Lo hicimos en Madrid, en 1990, en la Facultad de Biológicas. Por supuesto, no existía el correo electrónico, pero sí había fax. Y a mí aquello me parecía un milagro... ¡Las comunicaciones del congreso se enviaban por fax!... Pero pasados dos o tres meses, ¡ese fax se velaba! En ese primer congreso nos pasó de todo. Llevaba todos los materiales del Congreso en el maletero de mi coche y, de repente, ¡el coche desapareció! Y yo me decía: "¡Dios mío, que se lo haya llevado la grúa! ¡Que no me lo hayan robado!" Se lo había llevado la grúa la noche antes. Casi me da un infarto. Pero el congreso fue un gran éxito. Fue el primer dinero que tuvimos "sólido" en la SECAL. Asistieron unas 300 personas, incluyendo gente de otros países. Y había 15 ó 20 stands.

ADL: En esa época, se constituyó en España otra sociedad con objetivos similares a la SECAL, la llamada Sociedad Española de Experimentación Animal (SEEA). Las relaciones no siempre fueron fluidas entre ambas asociaciones. Pero ¿por qué la SEEA terminó desapareciendo y la SECAL en cambio cumple ahora 25 años?

JP: Yo creo que, desde el principio, nosotros tuvimos más claro dónde se quería ir. Queríamos ser partícipes de lo que se estaba tratando de hacer. Teníamos muy poquito crédito porque aún éramos algo incipiente, sin apenas sedimento. El ganar crédito frente a las instituciones oficiales que, lógicamente, no querían tener dos interlocutores, era muy difícil.

Teníamos muy clara la importancia de las personas que nos tenían que representar, así que no tuvimos duda en nombrar a Eduard Goñalons como primer presidente.

Los profesionales que estábamos en aquel momento teníamos los objetivos muy claros, y sabíamos que la gente mejor formada estaba en Cataluña y que Goñalons tenía que ser la persona que lo iniciase, aunque quizás hubiera personas con más carisma.

JC: Se cuidó mucho el aspecto de la imagen que debíamos dar ante la Administración. Y también teníamos clara otra cosa, y es que nos teníamos que hacer un currículum que empezaba con muchos años de retraso con respecto a la SEEA. Y sabíamos que en un plazo de un par de años teníamos que ser capaces de presentarnos y decir: esto es lo que hemos hecho, los socios que tenemos, los actos internacionales a los que hemos ido, los grupos de trabajo en que hemos participado, las revistas que editamos, los cursos de formación que hacemos, el número de alumnos que han pasado por ellos, etc. Esto es lo que permitió definir el interlocutor a la Administración, porque seguramente nosotros pusimos más empeño que la SEEA.



Foto: Lara Sedo

ADL: ¿Qué cambios percibís desde que la SECAL se constituyó hasta la actualidad? ¿Percibís una evolución siempre positiva? ¿O hay algo que creéis que pueda estar derivando negativamente?

JP: La SECAL ha crecido de forma muy armónica. No se han visto protagonismos dentro de las Juntas de Gobierno, desde el primer día de trabajo a la gente no se le ha puesto ninguna traba y se le ha dado toda clase de facilidades para garantizar la continuidad.

Ha habido muy buenos profesionales, no sólo desde el punto de vista directivo, sino en su conjunto. Yo diría que ha crecido con ganas.

CFC: Para mí, una de las mayores diferencias es que antes trabajábamos tres o cuatro. Ahora trabaja todo el mundo, y además con gusto.

JC: No tengo datos actualizados de la proporción de categorías profesionales (o de funciones, como define ahora el nuevo Real Decreto) de los socios de la SECAL.

Pero uno de los objetivos que siempre hemos tenido, y no sé si hemos avanzado adecuadamente, es el de incorporar a más gente de la que trabaja como personal cuidador y técnico.

Aunque siempre se ha querido una única sociedad para todas las categorías, y nunca se ha prohibido el ingreso a nadie, creo que hay que trabajar en estrategias para incorporar de pleno a estos profesionales. En mi experiencia, siempre que he intentado animar a las personas de este ámbito que han colaborado conmigo para que conocieran el tema, apuntándolos a cursos, congresos, etc., no he conseguido consolidarlo. Es una población muy pequeña. Supongo que hace falta hacer conocer la existencia de la SECAL, y también hacer ver a la gente de lo útil que les puede resultar si van a seguir trabajando en este campo.

JP: En algunos países, como el Reino Unido, hay asociaciones de técnicos y cuidadores de animales de laboratorio. A esto es a lo que habría que llegar, porque quien mejor va a cuidar al animal es el cuidador. Y si eso falta, quizás la revista u otros medios de difusión, debería encontrar ahí un hueco en donde ellos puedan acudir para encontrar parte de lo que necesitan profesionalmente.

ADL: Por último, ¿cuál pensáis que es el secreto de que esta sociedad se siga manteniendo con ese espíritu de colaboración, sin escisiones, ni conflictos?

CFC: Un factor diferencial importantísimo fue que la SECAL nació con el espíritu de que todo el mundo participara en ella, desde el cuidador hasta el catedrático, o el director de un animalario. No había distingos. Aquí siempre se han integrado todos, nunca se ha planteado otra cosa. En el primer Congreso de la SECAL recuerdo que el entonces presidente de FELASA, al ver que nos llevábamos todos tan bien, dijo "qué bien, una sociedad en la que no hay *prima donnas*".

JP: Otra cosa que aglutinó mucho fueron las facilidades de la formación dentro de los animalarios, porque eso hizo crecer

profesionalmente a las personas y ganar prestigio. A mí me recibió gente, yo recibí a gente, vosotros seguramente también...

...El haber pasado por un sitio determinado les hacía ganar cohesión e identificarse más con la profesión. Además, la poca información que recibíamos (cursos de formación u otras actividades en el extranjero) la repartíamos y difundíamos inmediatamente.

Y hubo otro hecho importante. En un momento determinado, antes de salir el Real Decreto (hablamos del año 1985), el Ministerio de Educación y Ciencia creó un comité de representantes de investigadores y del mundo del animal de laboratorio. En una reunión entre Administración y comité se planteó que para ser director de un animalario había que tener el doctorado y una serie de publicaciones concretas, o haberse formado en centros de referencia en el extranjero. Ninguno de nosotros tres, por ejemplo, podíamos serlo en ese momento...

CFC: Javier asistía a estas reuniones del Ministerio y nos alertó de este tema. Dimos la voz y, entonces, el Instituto de Toxicología de Madrid convocó una reunión en el Ministerio para presentar el Decreto que estaba a punto de salir. Éramos unas 300 personas en esa reunión; vino todo el mundo. Los del Ministerio se quedaron paralizados porque no sabían qué era aquello. Les dijimos que si eso seguía adelante, ninguno de los allí presentes iba a poder trabajar en su actual puesto. Así que se paralizó el tema.

JP: Es algo que ya se nos ha borrado, pero creó una cohesión de identificación y de compañerismo tremendo. A partir de ahí las cosas empezaron a rodar de otra forma. Fue fantástico.

CFC: Yo creo que esa manera de ser la ha conservado la SECAL, y no ha habido protagonismos. Y seguimos llevándonos todos bien. Y la cantidad de amigos que hemos hecho...

JC: Una cantidad de amigos que se puede ver a través de SECAL-L y a través de las jornadas y congresos, que cuando uno pide si alguien sabe algo de un ratón determinado, no te lo traen a casa porque no deben tener tiempo... (risas)

Y es que el espíritu de todos los socios es el de echar una mano a todos los que pidan ayuda, y un poco más. Y otra cosa que aún conservamos y que hay que mantener –y que nadie se entere– es que ya empezamos a saber bastante. Porque esta sensación de que vamos retrasados, de que hemos empezado tarde, de que cuando aquí hemos hecho el primer curso, en Francia ya lo hacían poco después de la Revolución, de aquella “guerra” de hacer currículo, etc., nos ha estimulado a hacer muchas cosas y a apuntarnos a todo. Y esto último lo han comentado sociedades de fuera y organismos. En FELASA, cada vez que se quería crear un grupo de trabajo, tenían que sacar a gente de SECAL. Esta sensación de “me he quedado retrasado”, “me quedé corto”, mantiene nuestro nivel de actividad. Hay mucha gente pensando qué más puede hacer y en qué más se puede implicar. Esto, y el compañerismo de verdad, el de ayudar, es lo que tiene la SECAL.

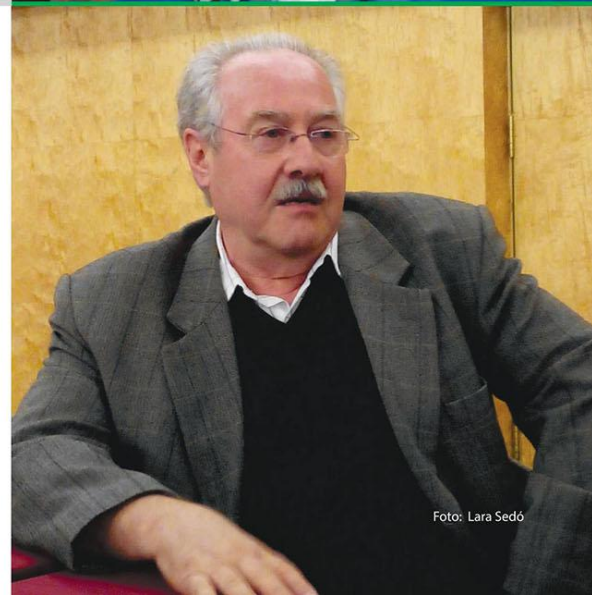
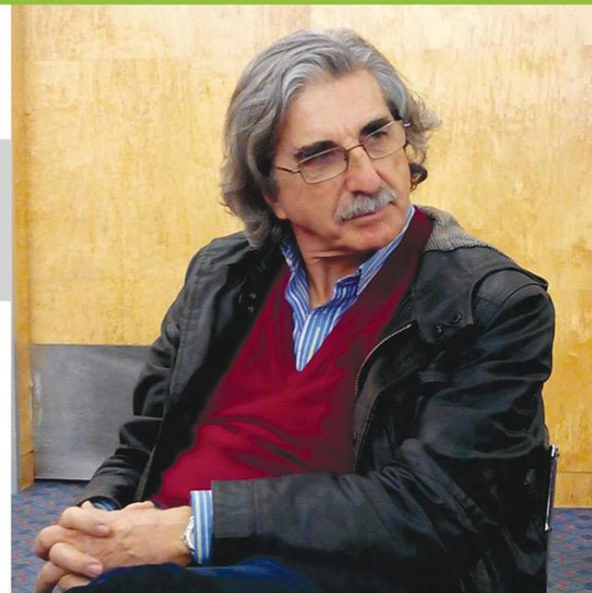


Foto: Lara Sedó

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 JRS



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



Implante subcutáneo (heterotópico) y ortotópico de tumores de páncreas para la generación de xenoinjertos derivados de pacientes

Camino Menéndez, Natalia Baños, Yolanda Durán, Victoria Bonilla y Pedro P. López-Casas

*Unidad de Investigación Clínica de Tumores Digestivos (Programa de Investigación Clínica)
Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)*

INTRODUCCIÓN

Los modelos de xenoinjertos derivados de pacientes con cáncer (las siglas en inglés son PDX) se generan mediante el implante de fragmentos tumorales humanos en ratones inmunodeprimidos. Estos modelos animales son de gran utilidad en la investigación oncológica y pueden tener una repercusión importante en el tratamiento de los pacientes (1). El proceso de generación de un PDX comienza con la recogida de la pieza de tumor en la cirugía oncológica y su examen por un anatomopatólogo. El patólogo proveerá de una fracción de tumor viable, que no comprometa el diagnóstico y, a continuación, la muestra donada será procesada para su implante.

Existen dos técnicas habituales de implante del tumor en el ratón inmunodeprimido: el implante subcutáneo y el ortotópico – ver (2) para una revisión. En el primer caso el fragmento de tumor se sitúa bajo la piel del flanco del ratón, en la región paravertebral dorsal de la mitad posterior. En el caso del implante ortotópico, el fragmento de tumor se emplaza en el órgano homólogo al del que procede el tumor; en nuestro caso es el páncreas.

Estos modelos preclínicos son esenciales para el desarrollo de nuevos fármacos antitumorales; además, permiten el rastreo de marcadores moleculares diagnósticos, pronósticos y predictivos de respuesta a fármacos, y son de gran utilidad para la implementación de medicina personalizada (1,3).

CONSIDERACIONES BÁSICAS ANTES DE EMPEZAR CON LA TÉCNICA

- Todo el material quirúrgico deberá estar esterilizado mediante autoclave.
- Se utilizará un único juego de material quirúrgico por animal sometido al procedimiento.

- Todo el procedimiento quirúrgico se llevará a cabo en una cabina de flujo laminar, en condiciones estériles.
- En caso de realizar la técnica en una línea de animales con pelo, proceder al correcto rasurado del área anatómica de trabajo.

EQUIPOS Y MATERIALES

- Hembras de la línea de ratón atímico Nude-Foxn1 (*nu/nu*), de 5-6 semanas de edad.
- Equipo de anestesia (vaporizador de Isoflurano) con cámara de inducción (ver Figura 2A).
- Cabina de flujo laminar.
- “Plasticware”: Falcon de 15 ml, microtubos de 1.5 y 2 ml, placas de 100 mm y de 6 pocillos.
- Micropipeta Gilson P-1000 y puntas.
- Medio RPMI 1640 y Penicilina/ Estreptomina.
- Etanol 70% o solución desinfectante para superficies.
- Gasas.
- Toallitas desinfectantes de alcohol isopropílico.
- Buprex (Buprenorfina: 0.05 mg/kg; volumen de inyección: 4 ml/kg).
- Suero salino (0.9% NaCl).
- Jeringas y agujas de insulina.
- Matrigel.
- Hielo.
- Material quirúrgico para pequeño animal (Tijeras, pinzas, bisturís).
- Grapadora quirúrgica, grapas (9 mm) y quitagrapas.
- Sutura reabsorbible 4-0 para el implante ortotópico.
- Marcador de oreja para identificación de los animales.
- Bata, guantes y mascarilla.

PROCEDIMIENTO

1) Preparación de los implantes: Se utilizará medio de lavado, que consiste en 5 ml de antibiótico (Penicilina/ Estreptomina) en 500 ml de RPMI 1640. En una placa de 6 pocillos se lava la pieza tumoral (ver Figura 1A) dos veces en el medio de lavado. A continuación, en una placa de Petri de 100 mm se fragmenta el tumor con un bisturí, hasta conseguir piezas cúbicas de aproximadamente 2 mm de lado (ver Figura 1B). Se consiguen tantas piezas como ratones se pretenda implantar (ver Figura 1C). Los fragmentos de 2x2x2 mm³ se emben en Matrigel (extracto proteico rico en elementos de la matriz extracelular con función nutricional y de sostén del implante), en un microtubo de 1.5 o 2 ml (ver Figura 1D) y se mantienen en hielo a una temperatura entre 0°C y 4°C (por encima de este rango de temperatura el Matrigel solidifica).

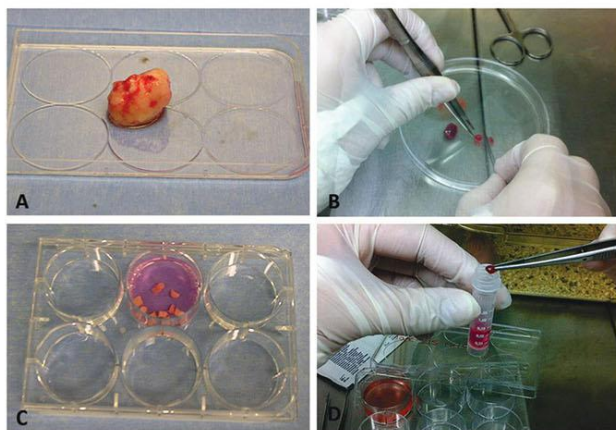


Figura 1. Preparación del implante. **A:** Pieza representativa de tumor de páncreas. **B y C:** Fragmentación del tumor en implantes de forma y tamaño homogéneo. **D:** Inclusión de los implantes en Matrigel.

2) Cirugía:

2.1.) Implante subcutáneo.

Se coloca el animal en la cámara de inducción del equipo de anestesia (Isoflurano al 3-3.5% - ver Figuras 2A y 2B). Una vez inducido, el animal se traslada a la plataforma quirúrgica y se le adapta la máscara de anestesia al hocico para mantenerlo anestesiado (Isoflurano al 2-2.5%). El animal se coloca en decúbito prono. Antes de comenzar la cirugía se administra la analgesia: inyección subcutánea de 0.1 ml de Buprenorfina (Buprex) a 0.0125 mg/ml (dilución en suero salino) en el cuello, con una jeringuilla de insulina (ver Figura 2C). A continuación, se desinfecta el área

anatómica de trabajo, en concreto la región dorsal posterior, con toallitas desinfectantes de alcohol isopropílico. Se practica una pequeña incisión con las tijeras en la piel de la región paravertebral dorsal posterior en un flanco, abriendo un "bolsillo" subcutáneo con la punta de las pinzas o con el extremo de unas tijeras (ver Figuras 2D y 2F). Se introduce un pequeño fragmento de tumor humano (2x2x2 mm³), previamente embebido en Matrigel (conservado en hielo entre 0°C y 4°C de temperatura), en el bolsillo subcutáneo que se ha preparado (ver Figuras 2G y 2H). Finalmente, se suturan las incisiones cutáneas con grapas de 9 mm (ver Figuras 2I y 2J).

Cuidados postoperatorios: El animal se mantendrá caliente y monitorizado hasta que recupere la consciencia tras retirar la máscara de anestesia (ver Figura 2K). En el caso de que se identifiquen síntomas de dolor, se administrará analgesia (Buprex) cada 8-12 h. Las grapas se retirarán después de 7 días.

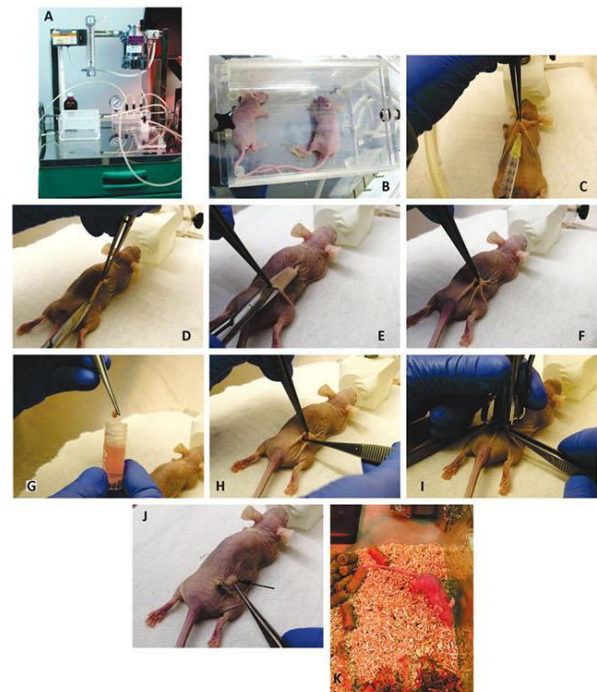


Figura 2. Procedimiento de implante subcutáneo. **A:** Equipo de anestesia (vaporizador de Isoflurano). **B:** Cámara de inducción mostrando dos ratones ya anestesiados. **C:** Administración subcutánea del analgésico (Buprex). **D:** Incisión en la piel con las tijeras en el flanco derecho. **E:** Disección del plano subyacente a la piel para la preparación del bolsillo subcutáneo. **F:** Imagen de la apertura resultante del bolsillo subcutáneo. **G y H:** Extracción del implante del baño de Matrigel e introducción del mismo en el bolsillo subcutáneo. **I:** Sutura de la incisión con grapas de 9 mm. **J:** Comprobación de la localización del implante en el bolsillo tras su colocación (indicado por una flecha). **K:** Animal despierto en la jaula, tras la cirugía, en este caso con implante bilateral.

2.2.) Implante ortotópico en páncreas.

Se coloca el animal en la cámara de inducción del equipo de anestesia (Isoflurano al 3-3.5%). Una vez inducido, el animal se traslada a la plataforma quirúrgica y se le adapta la máscara de anestesia al hocico para mantenerlo anestesiado (Isoflurano al 2-2.5%). El animal se coloca en decúbito lateral, mostrando el lado izquierdo del cuerpo. Antes de comenzar la cirugía se administra la analgesia: inyección subcutánea de 0.1 ml de Buprenorfina a 0.0125 mg/ml (dilución en suero salino) en el cuello, con una jeringuilla de insulina (ver Figura 3A). A continuación, se desinfecta el área anatómica de trabajo, la región dorsal paravertebral izquierda, con toallitas desinfectantes de alcohol isopropílico (ver Figura 3B). Se identifica la región de la piel bajo la que queda situado el bazo (por transparencia en el ratón atímico desnudo) y se practica una pequeña incisión con las tijeras en la misma (ver Figura 3C). Posteriormente, se practica otra incisión con las tijeras en la pared muscular del abdomen que ha quedado expuesto, hasta alcanzar la cavidad abdominal (ver Figura 3D). Suavemente se extrae el bazo hacia fuera con las pinzas y éste a su vez arrastra, en su salida, al páncreas (ver Figuras 3E y 3F). El tejido pancreático expuesto se despliega, extendiéndolo como si fuera una sábana. Seguidamente, se coloca un pequeño fragmento de tumor (2x2x2 mm³), previamente embebido en Matrigel (conservado en hielo entre 0°C y 4°C de temperatura), en la región central del páncreas desplegado y se envuelve con el mismo hasta preparar una especie de paquete. Se practica un punto de sutura reabsorbible que incluya el paquete de tejido pancreático y el fragmento de tumor (ver Figuras 3G y 3H). Se introduce todo el paquete, junto con el bazo, en la cavidad abdominal. Finalmente, se sutura la incisión en la pared muscular con 1 o 2 puntos de material reabsorbible (ver Figura 3I) y la incisión cutánea con grapas de 9 mm (ver Figuras 3J y 3K).

Cuidados postoperatorios: El animal se mantendrá caliente y monitorizado hasta que recupere la consciencia tras retirar la máscara de anestesia. Se administrará otra dosis de analgesia (Buprex) 24 h después de la cirugía. Las grapas se retirarán después de 7 días.

ASPECTOS A TENER EN CUENTA UNA VEZ FINALIZADA LA TÉCNICA

Una vez realizado el implante de los tumores en los animales es importante disponer de un método de seguimiento apropiado para evaluar el crecimiento de dichos tumores. En el caso del implante subcutáneo, el volumen tumoral se monitoriza

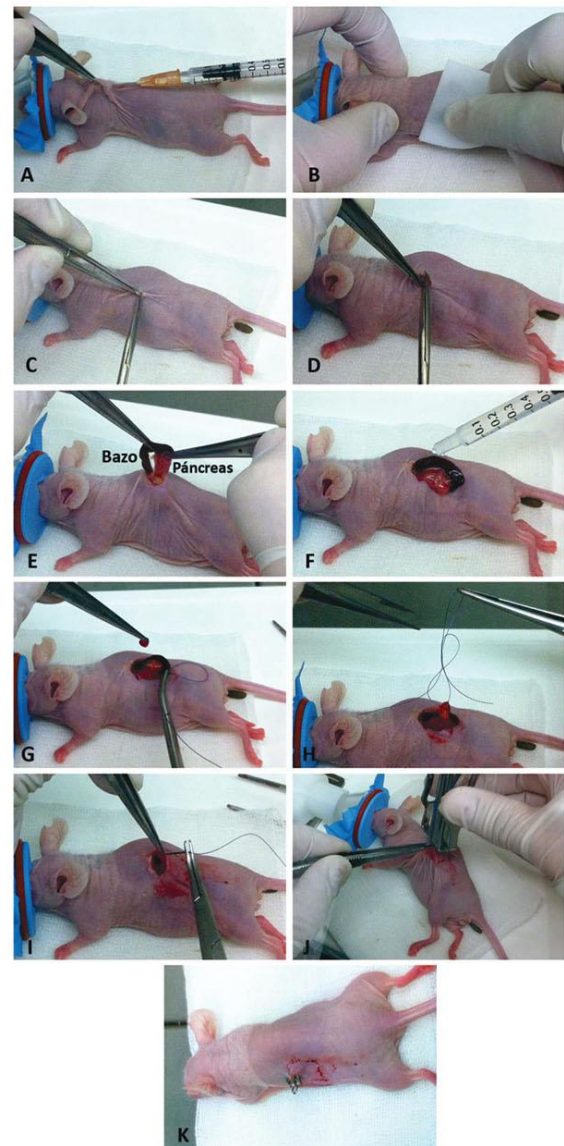


Figura 3. Procedimiento de implante ortotópico. **A:** Administración subcutánea del analgésico (Buprex) con el animal ya inducido en decúbito lateral (lado izquierdo expuesto) sobre la placa quirúrgica. **B:** Desinfección del área anatómica de trabajo con una toallita impregnada en alcohol isopropílico. **C:** Incisión en la región de la piel bajo la que se identifica el bazo por transparencia (lado izquierdo) y exposición de la pared muscular abdominal. **D:** Incisión en el plano muscular para acceder a la cavidad abdominal. **E:** Extracción cuidadosa del bazo, con el arrastre subsecuente del páncreas. **F:** Humectación de los órganos expuestos con suero salino. **G y H:** Colocación y sujeción, mediante sutura reabsorbible, del implante al páncreas. **I:** Sutura de la incisión en la pared muscular abdominal mediante 1 o 2 puntos de sutura reabsorbible. **J y K:** Sutura de la incisión en la piel con grapas de 9 mm.



Sodispan. s.l.
Research

www.sodispan.com

email: sodispan@sodispan.com

teléfonos: 629 039 890 - 629 159 613



Dietas
Lechos y Virutas
Jaulas y Racks
Sistemas acuáticos

Equipos
Enriquecimiento
Distribución
Soporte técnico

AQUANEERING
INCORPORATED

LabDiet

TestDiet Europe

a:CO

Esterilización de residuos patógenos en animalarios BSL-3

Javier Alonso Gómez

Director Técnico Ingeclima Grupo Albian

Este artículo, basado en un caso práctico de validación de un ciclo de esterilización de residuos sanitarios, trata de las dificultades asociadas a la esterilización eficaz de los residuos contaminados con agentes patógenos en animalarios, así como de las dificultades intrínsecas del envasado seguro, el transporte y la descontaminación eficaz.

En los animalarios y centros de experimentación en los que se trabaja con patógenos, se generan residuos que tienen que ser gestionados de forma segura hasta su completa esterilización.

Estos procesos de recogida y gestión están regulados por una legislación específica de Comunidades Autónomas, Ayuntamientos y otros organismos públicos que describen: los procedimientos de segregación, la clasificación, las características de los envases de recogida para cada tipo de residuo y su identificación, el almacenamiento intermedio, el circuito de transporte interior de los residuos y, en su caso, la recogida y el transporte extracentro para su posterior tratamiento y/o destino final.

La normativa vigente sobre gestión de los residuos sanitarios (tipificados como Grupo II en la Comunidad Autónoma del País Vasco y Grupo III en el resto) exige que, al menos, sean recogidos en bolsas, que requieren para su transporte un acondicionamiento previo en contenedores rígidos y estancos que deben etiquetarse con el pictograma de "bio-riesgo" de los residuos biocontaminados (ver Figura 1).

Habitualmente, para la gestión extracentro se utilizan contenedores de polietileno duro de alta densidad o similar con cierre irreversible estanco. Esta evidente necesidad de los contenedores es la que hace especialmente difícil el proceso de esterilización por autoclave.

El tratamiento tradicional, recogido en la normativa vigente, es la esterilización por autoclave. Para ello tenemos que asegurarnos que en el proceso de esterilización se consigue:



Figura 1.- Preparación de muestras, bolsas y contenedores rígidos para una validación.

- Eliminar todas las formas vegetativas de las bacterias, micobacterias, hongos y esporas de hongos.
- Eliminar los virus.
- Eliminar las esporas del *Bacillus anthracis*.

En general, tenemos que validar el proceso de esterilización para la casuística más desfavorable, en la que tenemos que incluir: el estudio del tipo de residuo, tipo de envase primario (bolsa y cierre) y envase final para el transporte (caja rígida de cierre irreversible).

En la nueva normativa encontramos que se aceptan recipientes semirrígidos, que se cierran de manera que impiden la apertura accidental. En cada caso, es recomendable un análisis de los riesgos para justificar el recipiente elegido.

En cualquiera de los casos, los diferentes formatos de envase, que pueden llegar a una autoclave para su esterilización, tienen que ser sometidos a un proceso de validación, ya que no hay evidencias de que un ciclo de autoclavado pueda servir para todos los formatos de envases.

Validación del ciclo de autoclavado

Para los ensayos de validación inicial de un ciclo de autoclavado, debe ajustarse el ciclo del proceso hasta que al menos tres pruebas consecutivas cumplan con los criterios de reducción logarítmica exigidos. Los parámetros operativos correspondientes a las pruebas exitosas (tiempo de exposición, temperatura y presión) deben documentarse. Las condiciones operativas para todas las cargas futuras, incluidos los tipos de envases, deberán respetar dichos parámetros y, a su vez, deberán registrarse.

Para realizar esta validación, se utiliza una prueba de provocación microbiológica mediante el empleo de indicadores biológicos autocontenidos de esporas de *Geobacillus stearothermophilus*, embebidas en portadores, que se colocan dentro de una bolsa con residuos y de su caja correspondiente, para demostrar una reducción de las esporas bacterianas igual o mayor a 4 Log10.

Un indicador biológico autocontenido (SCBI) es una tira de esporas dentro de un recipiente que a su vez contiene un medio de cultivo dentro de una cápsula interna precintada. Se utiliza un tapón perforado junto con un filtro hidrófobo que actúa como barrera bacteriana. El recipiente se coloca dentro de una carga testigo y se recupera una vez finalizado el tratamiento de esterilización.

Para la realización de las pruebas de validación, se utiliza una varilla a la que se ata el indicador biológico adecuadamente etiquetado (ver Figura 2).

Se tienen que colocar tantos indicadores biológicos como sea necesario, en función del tamaño de la autoclave y de su formato de carga, para tener una muestra adecuada de todo el volumen de la carga.

El ciclo de esterilización de la autoclave (ver Figura 3) tiene que tener las siguientes fases:

1. Fase de Presurización – Rotura de bolsas y cajas.
2. Fase de Vacío – Rotura de bolsas y cajas.
3. Fase de calentamiento.
4. Tiempo de estabilización.
5. Fase de Esterilización – Tiempo de exposición.



Figura 2.- Preparación de los indicadores biológicos para la validación de un ciclo.

6. Fase de Condensados.
7. Fase de Secado y Enfriamiento.
8. Final del Ciclo.

Las primeras fases de presurización y vacío son de especial importancia, ya que son las que permiten romper los envases en los que hemos colocado los residuos. Las cajas rígidas de cierre irreversible tienen que ser sometidas a niveles de vacío de hasta -850 mbar para conseguir deformarlas, romper su estanqueidad y permitir, de ese modo, la adecuada penetración del vapor en su interior.

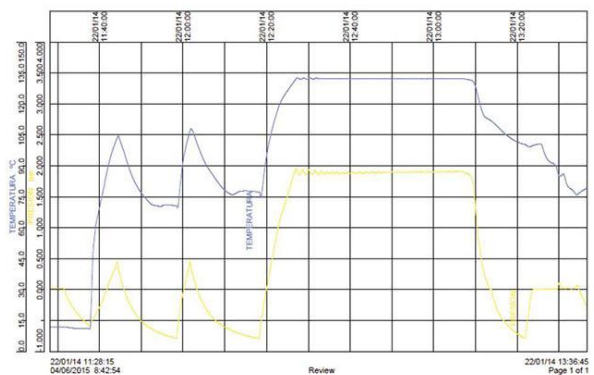


Figura 3.- Gráfica de ciclo validado.

Es significativo que los resultados de un ciclo validado, con los formatos de carga descritos, nos llevan a tiempos de ciclo de 2 horas, siendo de vital importancia las fases iniciales de rotura de

cajas y bolsas. No obstante, estos tiempos son orientativos y dependen de las características técnicas de cada autoclave.

Durante el proceso de validación, se coloca una sonda inmersa en el interior de la carga para tomarla como temperatura de referencia (ver Figura 4). Esta sonda permite observar durante el proceso de validación la diferencia de su medida con la temperatura medida en el interior de la cámara de la autoclave. Diferencias de hasta 10 y 15 °C durante las primeras pruebas, sin rotura de cajas, indican que la caja y su estanqueidad funcionan como un aislante térmico condicionando enormemente el proceso de esterilización. Tras ajustar las consignas de vacío y sobrepresión de las fases 1 y 2, y conseguir deformar las cajas (ver Figura 5) y romper las bolsas interiores, se observa que las temperaturas de la cámara y de la sonda de inmersión de la caja acaban coincidiendo, lo que supone una apertura eficaz de las cajas y las bolsas en las dos primeras fases del ciclo.



Figura 4.- Sonda de temperatura insertada en el interior de la caja.



Figura 5.- Cajas deformadas tras el ciclo de autoclave.

Conclusiones

1. Para garantizar la seguridad en el transporte de los residuos patógenos de un animalario tenemos que utilizar una caja rígida de cierre irreversible, según la normativa fijada para cada Comunidad Autónoma.
2. Este tipo de cajas, estancas, hacen que la penetración del calor de la autoclave hasta el interior de la caja sea baja, cuando no hay garantías de haber podido abrir por deformación la caja en las primeras fases del ciclo de autoclavado.
3. No es evidente que un ciclo de esterilización sirva para todos los formatos de envases en los que se transportan los residuos con carga patógena. Debe haber una validación para cada caso.

Agradecimientos

- A Sterile Services S.L. por permitirnos la publicación de las conclusiones del trabajo que realizamos juntos.

BIBLIOGRAFÍA

- DECRETO 83/1999, de 3 de junio, por el que se regulan las actividades de producción y de gestión de los residuos biosanitarios y citotóxicos en la Comunidad de Madrid.
- DECRETO 21/2015, de 3 de marzo, sobre gestión de los residuos sanitarios en la Comunidad Autónoma de Euskadi.
- DOCUMENTO ORIENTADOR PARA PRUEBAS DE PROVOCACIÓN MICROBIOLÓGICA EN AUTOCLAVES UTILIZADOS PARA EL TRATAMIENTO DE RESIDUOS GENERADOS POR LA ATENCIÓN DE LA SALUD. Proyecto global PNUD/FMAM sobre residuos generados por la atención de la salud; Documento orientador para pruebas de provocación microbiológica, United Nations Development Program 31/7/2012.
- Esterilizadores de Gran capacidad UNE-EN 285 2007-2009.



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 guarantee table at
www.granjasanbernardo.com

Comunicar bien para investigar mejor

Enrique Sueiro

Doctor en Comunicación, asesor y autor del libro "Comunicación y ciencia médica: investigar con animales para curar a personas" (CSIC)

www.enriquesueiro.com

Habla el que no sabe y el que sabe no habla. Revertir esta triste realidad es posible y muy necesario para el progreso social. Guste o no, la opinión pública de hoy es la legislación de mañana y, en ese sentido, configura la sociedad del futuro.

Saber comunicar es una habilidad particularmente útil en el ámbito científico. Las consecuencias de comunicar bien la investigación con animales no se reducen a una mera capacitación personal. Conllevan beneficios en parámetros tan tangibles como la financiación, el apoyo institucional y la relevancia internacional.

Como sucede a menudo, percibimos necesidades formativas en modo curativo, después de que ha estallado una crisis; cuando hacerlo en formato preventivo resulta más eficaz y menos doloroso, incluso más económico. Algo así debieron de pensar algunos de los muchos implicados, personales y corporativos, en el caso del Hospital Northwick Park de Londres. Seis voluntarios sanos que participaban en un ensayo clínico para probar un fármaco experimental estuvieron al borde de la muerte por los efectos de las dosis que recibieron, 500 veces inferiores a las previamente suministradas con éxito a monos.

El caso añade complicación al implicar no sólo al Hospital Northwick Park de Londres, donde se realizaron los ensayos clínicos; sino también a la compañía estadounidense Parexel, responsable de las pruebas; la farmacéutica alemana TeGenero, que desarrolló el nuevo producto (el anticuerpo monoclonal TGN1412); y la *Medicines and Healthcare products Regulatory Agency* (MHRA).

Formarse también para comunicar

Formarse seriamente para comunicar investigación con animales sensibiliza para afrontar con seguridad situaciones de

controversia. Es el momento de ser capaces de armonizar la conciencia de estar contribuyendo a mejorar la vida de muchas personas con la habilidad de transmitir esa realidad de forma convincente.

Una premisa que puede desconcertar es que la mejor comunicación es la que empieza por escuchar con voluntad de comprender. De ahí que cuanto mayor hostilidad exhiba un determinado público, mayor esfuerzo debemos poner en escuchar. Comprender no supone justificar, ni mucho menos apoyar. Sólo al comprender somos capaces de razonar desde el punto de vista del interlocutor, enfoque decisivo para una comunicación eficaz de nuestra postura.

Tras la premisa de escuchar, un primer criterio pasa por la conveniencia de adelantarse. Tomar la iniciativa, además de transmitir liderazgo, facilita establecer el marco argumental, priorizar los elementos de debate social que más nos interesen y ganar tiempo. El silencio sólo es lo más prudente en ciertas ocasiones. Además, limitarnos a reaccionar ante críticas nos convierte sutilmente en el sustantivo propio de ese verbo: reaccionarios. La actitud contraria, sin embargo, forja líderes.

Datos, contexto y emociones

Una vez formados y concienciados de la importancia de adelantarnos a comunicar (y no sólo reaccionar), tres son los elementos que debemos conjugar con maestría: datos, contexto y emociones. Los primeros son, quizá, los más sencillos porque forman parte de la esencia de la investigación biomédica. Aun así, yerran estrepitosamente quienes basan su comunicación científica sólo en los datos, que deben seleccionarse con cautela para que un exceso de información no se convierta en generador de confusión.

Entre los datos oportunos para recordar figuran los avances hoy cotidianos –aunque apenas para parte de la humanidad– alcanzados gracias a experimentos con animales: vacunas, transfusiones, trasplantes, analgésicos, anestésicos, etc. Muchos desconocen que en 1921 se descubrió la hormona insulina, gracias a las investigaciones de Frederick Banting y Charles Best en el páncreas del perro. Al ser una enfermedad incurable, los tratamientos conseguidos han supuesto un alivio para millones

Factor Humano

de enfermos en todo el mundo que han pasado de tener que morir por diabetes a poder vivir con diabetes.

Tampoco está de más repasar la lista de Premios Nobel de Medicina y comprobar que la mayoría utilizó animales para alcanzar los hallazgos de los que ahora se benefician tantas personas... y tantos animales.

Contextualizar: hacer explícito lo implícito

Los datos, por tanto, ayudan a comprender una realidad que es poliédrica, multicolor y cambiante. Por eso los datos requieren un contexto de interpretación, como refleja el conocido chiste que contaba los resultados de cierto ensayo en ratones: el 33% se curó, el 33% murió y el tercer ratón se escapó. También en biomedicina, el porcentaje no es una referencia fiable si la muestra no es significativa.

Contextualizar implica muchas veces hacer explícito lo implícito y recordar ciertos criterios integrados en la conducta profesional de muchos especialistas de la experimentación con animales y, sin embargo, ignorados por el público general. Uno de esos casos puede ser el criterio de las 3Rs: reemplazar los animales por otros métodos eficaces de verificación siempre que sea posible, reducir al mínimo imprescindible el número de los utilizados, y refinar el trato y las condiciones de animales de laboratorio. Tan importante como saberlo es practicarlo.

Además de los datos y su contexto, no menos decisivas son las emociones que se transmiten y las que se perciben, que no siempre coinciden. Un principio elemental de comunicación recuerda que lo decisivo no es lo que yo digo, sino lo que los demás interpretan. Aquí el componente emocional juega un papel determinante, como bien saben y practican los grupos que se oponen a la investigación con animales. Entre los muchos testimonios que recopilé durante mis investigaciones, el de Laura Cowell me resulta de la máxima eficacia. Esta joven paciente declara: "Para controlar mi fibrosis quística y diabetes tomo diariamente entre 50 y 70 comprimidos, dos inyecciones de insulina y dos nebulizadores. Esas medicinas se han probado antes en animales, por lo que estoy muy agradecida a las personas y a los animales. Sin ellos, estaría muerta".

La gestión de las emociones se torna tan crucial en la comunicación que autores como Lukaszewski hablan de las matemáticas de la realidad, que desglosa en 15% de hechos y

85% de emociones y percepciones. Porcentajes al margen, minusvalorar esta combinación garantiza fracasos comunicativos casi al 100%.

Comunicar bien la investigación con animales requiere también dosis de autocritica para reconocer errores y malas prácticas cuando se produzcan y se denuncien, como en cualquier ámbito profesional.

Gracias a la investigación doctoral descubrí realidades que me resultaban difíciles de creer y que contradecían algunos presupuestos que, por ignorancia, me ubicaban en ideas y sensibilidades equivocadas. Después de leer sus libros, tuve la suerte de mantener un encuentro personal con Peter Singer en Nueva York. Por eso coincidí con él en denunciar aberraciones cometidas en el pasado contra los animales al amparo de la ciencia. Me parecen abusos impropios de la condición humana. Le agradecí que, con sus libros, me abriera los ojos y la mente en un asunto desconocido para mí hasta entonces. Ese nuevo conocimiento me llevó a cambiar de opinión, por el elemental motivo de que yo desconocía una verdad. La ignorancia estrangulaba mi sensibilidad sobre el respeto que merecen esos seres vivos.

Identificar públicos clave, tomar la iniciativa y actuar con cautela

Conversando con el profesor de Princeton comprobé cómo estimulan los diálogos enriquecedores cuando buscamos honestamente la verdad. Junto con algunos puntos en común, también constaté diferencias sustanciales. Años después de conversar con el profesor Singer, aún hoy trato de entender su postura, pero no alcanzo a asimilar su equiparación entre animales y seres humanos. Así se lo dije.

Comparto más bien la idea de Kant cuando afirma que "en el reino de los fines todo tiene un precio o una dignidad. Aquello que tiene precio puede ser sustituido por algo equivalente; en cambio, lo que se halla por encima de todo precio y, por tanto, no admite nada equivalente, eso tiene una dignidad". El profesor Singer y yo también hablamos de dignidad... y discrepamos, pero seguimos buscando nuevas verdades y, por tanto, abiertos a cambiar de opinión.

También en el ámbito anglosajón, debo gran parte de mi aprendizaje y experiencia de comunicación en el ámbito de la

investigación con animales a la *Understanding Animal Research* (UAR) cuya página web ofrece uno de los espacios más completos y solventes que conozco (www.understandinganimalresearch.org.uk).

Editado por la UAR, *A Researchers' Guide to Communications* es de los mejores documentos publicados por una entidad profesional centrada en este campo científico. Pretende contribuir a la mejora comunicativa de universidades y centros de investigación sin atraer la atención de manera indeseada. Con ese objetivo propone una actitud proactiva y transparente en la difusión de información, de manera que fortalezca la confianza y el apoyo del público.

En este sentido, resalta el creciente interés de la sociedad para formarse una opinión acerca de estas cuestiones y lamenta que en el pasado la gente recibiera más información de los grupos activistas que de los propios investigadores. Mantener la pasividad comunicativa no impide que los opositores hallen la información que buscan y la utilicen, empezando por los artículos publicados en revistas científicas o los datos ofrecidos en la web de los centros de investigación. La UAR aboga por identificar los públicos clave, tomar la iniciativa y, a la vez, actuar con cautela.

De la comunicación interna a la proyección pública

Asimismo, la UAR destaca la importancia de la comunicación interna a tiempo, antes de actuar en la opinión pública. Para esta posterior comunicación externa detalla seis puntos:

1. Utilizar la web para exponer la política institucional sobre la investigación con animales.
2. Planificar cuidadosamente determinadas visitas para que conozcan el centro de investigación algunos profesionales decisivos en la opinión pública y que, al mismo tiempo, no estén familiarizados con el quehacer de la investigación con animales: por ejemplo, políticos, líderes sociales y periodistas.
3. Antes de difundir informaciones sobre la investigación con animales, diseñar esa comunicación en alianza con los investigadores implicados.
4. Elaborar un texto con preguntas-respuestas que sirva de documentación sobre el trabajo científico realizado en el centro de investigación.
5. Ser consciente de los diversos modos en que los medios pueden informar sobre la institución.
6. Entrenar a los investigadores para facilitar su comunicación con la prensa (*media training*).

Entre los aspectos resaltados por la UAR figura la anticipación para facilitar imágenes, entre otras razones, porque muchos periodistas sólo disponen de las procedentes de las organizaciones antiviviseccionistas. También anima a diseñar los mensajes con ingenio y, como ejemplo, muestra el caso de una universidad neoyorquina: al enterarse de que un grupo de activistas pensaba boicotear un proyecto de investigación, el día previo a la protesta convocaron una rueda de prensa para ofrecer datos sobre los beneficios de la investigación con animales. Así, al día siguiente la cobertura mediática de la protesta se redujo significativamente en espacio y contenido.

Otra iniciativa ingeniosa fue el anuncio de la agencia de publicidad Bozell, Jacobs, Kenyon & Eckhardt. Sobre una foto con manifestantes contrarios a investigar con animales puede leerse la siguiente frase: "Gracias a la investigación animal, ellos podrán protestar 23.5 años más".

La no comunicación sólo prolonga la oposición

El criterio de comunicación constante (gota a gota) abarca también otras instancias cuyos efectos resultan palpables a medio plazo. Un ejemplo son las escuelas y otros centros de formación juvenil.

En esta línea, es oportuno mencionar el caso de un campus que sufría protestas mensuales por investigar con animales. Uno de los directivos afectados optó por expresar su apoyo a los manifestantes en aquello que consideraba razonable. Además, les acompañó a visitar el centro de investigación, con la prensa como testigo. Después de ver las instalaciones por ellos mismos, aunque quienes protestaban siguieron "filosóficamente opuestos" a la investigación desarrollada, admitieron que los animales estaban bien cuidados.

Es inteligente apostar por una comunicación anticipadora porque protege la reputación institucional, consigue mayor apoyo y anima a las autoridades a defender a los investigadores de los ataques extremistas. Muy esclarecedora la conclusión final: la no comunicación simplemente prolongará la oposición.

Si bien el caso del Reino Unido es muy particular, el hecho de tratarse del país con mayor sensibilidad social y tradición legislativa al respecto ofrece un modelo del que aprender para adaptar. Criterios y experiencias similares me han transmitido colegas de comunicación científica de centros de investigación

Factor Humano

de EE.UU. como el *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center*, *Mount Sinai Medical Center*, *Columbia University Medical Center*, *Dana-Farber Cancer Institute*, *Whitehead Institute* o el *National Cancer Institute* (NCI-NIH) y de sociedades como la *Massachusetts Society for Medical Research*.

Diez pautas para la acción

La provisionalidad de las conclusiones que marca todo quehacer científico sirve igualmente para el correspondiente mundo de la comunicación. El progreso de la ciencia y la sociedad precisan, hoy por hoy, investigar con animales para curar a pacientes. Tal desarrollo requiere control responsable, ético y legal. Una mejor comunicación de los avances ayuda a que la sociedad entienda el uso de animales. La gente corriente necesita datos y contexto para comprender el poliédrico mundo de la investigación médica. Parece razonable encontrar un punto medio entre las reacciones que priman lo emocional y los argumentos que omiten lo afectivo. Podemos conciliar respeto hacia los animales y dignidad para las personas.

Los mundos intervinculados de la investigación con animales y la comunicación pública son mucho más extensos, profundos, cambiantes y matizables de lo que apenas cabe esbozar en estas páginas. No es fácil sintetizar lo que requiere horas de aprendizaje y entrenamiento sobre este fascinante desafío de comunicar la investigación biomédica. Consciente de esta limitación, me permito concluir con estas pautas para la acción:

1. Adelantarse, prever lo previsible y contar lo contable.
2. Mimar la escucha y liderar percepciones.
3. Conocer la verdad, contar lo prudente y no mentir.
4. Prever preguntas clave y preparar respuestas adecuadas.
5. No incluir en tu respuesta una pregunta negativa.
6. Decir lo que se hace y hacer lo que se dice.
7. Mensajes: pocos, claros, amables, a tiempo y creíbles.
8. Armonizar datos, contexto y emociones.
9. Tono, estilo, vestuario y entorno adecuados.
10. Cometer siempre nuevos errores.

25
AÑOS
1.990 - 2.015

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


www.secal.es

 sociedad española
para las ciencias
del animal de laboratorio

www.secal.es

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

Área de lavado

Paloma García Potrero

Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)

Es un gusto estar con vosotros de nuevo, ya que significa que la sección de cuidadores va viento en popa. Daros las gracias a todos los que me habéis escrito para felicitar me por la sección y a los que me habéis enviado propuestas: esto significa que os gusta y entretiene. Seguid enviándome propuestas, ya que a los lectores y a mí nos interesan vuestros temas y vuestros día a día.

En este nuevo número os voy a presentar el área de lavado del CNIO. Esta área fue una de las primeras (2001) en tener un túnel de lavado automático con dos robots, un equipo de limpieza y un llenador de biberones llamado "Kronos". Para conocer mejor estos equipos, decidí juntarme con dos veteranos y simpáticos trabajadores, Julio César Castellanos y Francisco Afán, más conocidos como "César y Paco, los chicos de lavado" (ver Figura 1).

Lo primero que me contaron es cómo se iniciaron en el mundo de los animalarios. Rondaba el año 2009, en plena crisis, los dos estaban en paro y echaban Currículums Vitae (CV) desesperadamente por internet, presenciales... Dieron su CV a conocidos que trabajaban en la empresa y en seguida les llamaron, les gustó el tipo de trabajo y hasta día de hoy.



Figura 1.- César y Paco, los chicos de lavado.

Centrémonos un poco más en el cargo que desempeñan. Fundamentalmente, procesan el material sucio que se genera después de los cambios de cubetas y preparan el material limpio para introducirlo a las diferentes zonas estériles del animalario. Aunque no tienen contacto directo con los animales, también son cuidadores como el resto de compañeros, la diferencia radica en que son una parte distinta de la cadena de investigación, pero no por ello, menos importantes. Dentro de la gran y compleja área de lavado, Paco y César usan distintos tipos de equipos y materiales: detergentes para las distintas máquinas de lavado, desinfectantes como el Virkon - mezcla de compuestos peroxidados en forma de polvo soluble en agua - para desinfectar celdas completas y materiales que se introducen a barrera y no se pueden autoclavar ni pasar por el vaporizador de peróxido de hidrógeno (VHP), etc. Para manejar todos estos equipos y materiales adoptamos una serie de medidas indicadas en los Protocolos Normalizados de Trabajo (PNTs) del animalario, que todo el mundo tiene que leer los primeros días de trabajo independientemente de la zona del animalario en la que trabaja. Aparte de los detergentes y desinfectantes, también manejan a la perfección todas las máquinas que hay en el área de lavado, desde las autoclaves y el VHP, pasando por el túnel de lavado y sus dos robots, hasta la lavadora Basil 9500 y el Kronos (máquina compleja encargada de procesar los biberones de los ratones).

El área de lavado está compuesta por 4 personas, con distintos horarios, hasta las 9 de la noche. Todos saben perfectamente las tareas diarias y se organizan entre ellos según avanza el día, para que siempre quede todo hecho al final del mismo.

La tarea más importante que desarrollan es la de procesar el material sucio -cubetas, biberones, rejillas y cobertores - limpiarlo, lavarlo e introducirlo lo antes posible a la zona limpia de barrera para que puedan disponer de él. Para ello, tienen que saber el funcionamiento de las máquinas y estar atentos a los fallos o alarmas que puedan surgir, para corregirlos inmediatamente y que siga funcionando con normalidad. Además, se encargan de preparar la ropa limpia para introducirla a la zona estéril, preparar los desinfectantes, recoger los cadáveres de la zona de patología, cambiar los filtros de la cámara de anestesia... La zona de patología es donde los investigadores del CNIO bajan a recoger los ratones que les han sacado de la zona de barrera, principalmente para recoger muestras. Esta zona dispone de distintos equipos para facilitar que la toma de muestras sea lo más detallada posible.



Figura 2.- Paco y César en la zona de lavado.

Paco y César piensan que ha sido un avance sustituir el lavado manual por máquinas que se encargan solas de casi todo, sólo tienen que estar pendientes de que no fallen y sigan su funcionamiento normal y así, pueden adelantar otras tareas. Como todo tiene sus pros pero también sus contras, si fallan y ellos no lo saben resolver (p. ej.: el robot de lavado, a veces, aplasta las cubetas, tira pallets...) se para el lavado y no se puede procesar el material, retrasando sus tareas y, como consecuencia, las tareas de la zona de barrera.

Entre risas, me cuentan que es un trabajo entretenido, ya que no paran ni un solo momento. A lo largo del día, tratan con mucha gente, como investigadores que piden introducir material a barrera y tienen que saber la forma de hacerlo para que no se estropee, personal de mantenimiento cuando se estropean las máquinas, personal de barrera para que el trabajo fluya mejor, etc. Por las tardes, son el único personal de animalario que hay y les llaman para cualquier cosa.

Por último, una anécdota de cada uno. César cuenta que, hace unos meses, fue avisado sobre las 7 de la tarde, en vez de llamar a los de mantenimiento, para socorrer a una chica que llevaba encerrada en una de las celdas de barrera casi dos horas, y se le ha condecorado como su salvador. Paco comenta que, de vez en cuando, reciben visitas externas, sobre todo de colegios. Fue durante una de ellas que sacaron a una de las cuidadoras de barrera debido a un desmayo y no para de acordarse de la cara de asombro de los chavales, ¡fue genial! El animalario tiene muchas anécdotas y os lo aseguro, éstas son de las mejores.

Hasta aquí la entrevista con los chicos de lavado del CNIO. Para el próximo número hablaremos de otro centro. Espero, una vez más, haberos entretenido.

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

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

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

BIOSCAPE
E B E C O + E H R E T F U S I O N



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

Gases a presión

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

La norma UNE-EN 1089-3 modificó la identificación por colores de las botellas de gases a presión. Esta norma debió implantarse en julio del 2014, por lo que aprovechamos la ocasión para exponerla y dar unas normas básicas relativas al manejo de estas botellas.

Los gases a presión suelen aparecer en forma de 'botellas', cuyas partes más importantes para seguridad son la tulipa, el grifo, la conexión y la ojiva.

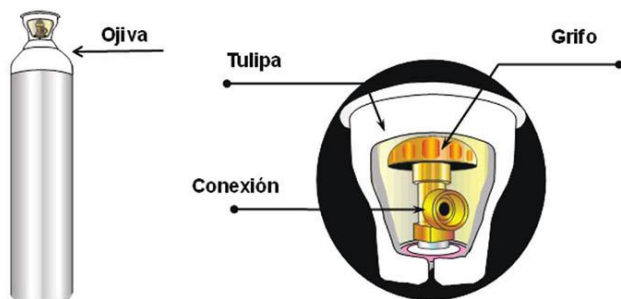


Foto: suministrada por el autor

El color de la ojiva indica el tipo de gas que contiene la botella. Ésta es la parte de la normativa que se ha modificado. La norma actual indica:

Regla general			
Color de riesgo	Antiguo sistema	Nuevo código europeo	
Tóxico/corrosivo	Verde (u otro)	Amarillo	
Inerte (argón y mezclas)	Amarillo o mezcla de colores	Verde intenso	
		Verde oscuro	
Inflamable	Rojo (u otro)	Rojo	
Oxidante	Blanco (u otro)	Azul claro	

Foto: suministrada por el autor

Aunque se mantienen los colores de los gases más habituales (que serán posiblemente los más usados en nuestras instalaciones):

Lo que no cambia			
Los gases habituales que no cambian son:			
Oxígeno	Blanco	Dióxido de carbono	Gris
Nitrógeno	Negro	Óxido nitroso	Azul
Hidrógeno	Rojo	Helio	Marrón

Foto: suministrada por el autor

Así, la bala de nuestra imagen inicial sería de oxígeno.

La tulipa es un sistema de protección que evita daños al grifo en casos de golpes o caída de las botellas. El grifo es la parte más 'sensible' y su rotura puede acabar en auténticos vuelos de las botellas impulsadas por el gas a presión a modo de cohete.

La conexión suele ser específica del tipo de gas y condiciona el material de conexión (evitar efecto del gas sobre el mismo), presiones de trabajo, tipo de tubos, etc.

NORMAS BÁSICAS DE SEGURIDAD EN EL MANEJO DE BOTELLAS DE GASES A PRESIÓN

NUNCA OLVIDAR. Los gases contenidos en las botellas tienen riesgos propios (asfixia, irritantes, tóxicos, inflamables...) que aunque aquí no comentamos deben ser tenidos en cuenta.

Los principales riesgos asociados al manejo de estas botellas son los daños físicos. Fundamentalmente, sobreesfuerzos en el manejo por el peso de las botellas, proyecciones asociadas a la presión de los gases en las mismas y golpes accidentales por caídas de las botellas.

Sobreesfuerzos

- Las botellas siempre deben moverse en carros adaptados a este uso. Si no puede hacerse así, deben rodarse en posición vertical sobre su base. Siempre una mano sobre la tulipa y otra en el cuerpo. Cuidado con 'pillarse los dedos'.

SEGURO EN 5 MINUTOS

- Para levantar una botella, agarrar de la tulipa con las piernas dobladas y la espalda recta.
- Si la botella debe subirse a otro piso/nivel, usar siempre montacargas.
- Nunca intentar sujetar una botella que se está cayendo.

Proyecciones

- La presión tipo de una botella de gas (200 bar) equivale a concentrar el peso de un elefante en la superficie de una tarjeta de crédito. ¡¡ MUCHÍSIMO !!
- Siempre cerrar el grifo antes de cualquier manipulación. Y drenar la presión residual.
- Nunca situarse frente a las salidas de gases (conexión) en los momentos de conexión/desconexión de botellas.
- Nunca forzar una conexión que no 'rosca', ni utilizar aceites o lubricantes (pueden interactuar con nuestros gases o alterar el ajuste de la conexión).
- Retirar las botellas con conexiones dañadas.

Golpes

- Las botellas deben estar siempre ancladas a un soporte/pared (cadenas generalmente).
- No dar la espalda a una botella recién colocada, salvo que esté anclada.
- Usar calzado de seguridad con protección de los dedos.
- Cuidado a dejar botellas detrás de las puertas; es un error habitual y un problema si alguien las abre.
- Atención al abrir el gas, los elementos flexibles deben estar fijados por un cable de seguridad; si están libres 'latigean'.

Esperamos que lo expuesto os ayude a evitar problemas.



Foto: suministrada por el autor



El utilitarismo y su relación con la *ética animal*

Jesús Martínez Palacio

Diplomado en Bioética
 Presidente del Órgano Habilitado
 y Órgano Encargado del Bienestar Animal del CIEMAT

El utilitarismo es una corriente filosófica fundada por Jeremías Bentham (1748-1832). Se clasifica como una corriente hedonista altruista a largo plazo (buscar el bienestar colectivo presente y futuro).

El utilitarismo surge unido al liberalismo económico de Adam Smith y a la defensa de la democracia representativa propia de las revoluciones francesa y americana. Es heredero de las ideas de la ilustración y del liberalismo. Este pensamiento nace como una postura eminentemente práctica aplicable a la reforma de las instituciones sociales.

Características del utilitarismo

La conducta individual y social del hombre ha de estudiarse a partir de la observación de los hechos concretos y de sus consecuencias, determinando qué hechos generan bienestar y cuáles no. Este concepto es la base del "balance ético" que aplicamos en la mayoría de los comités de ética animal para la toma de decisiones.

Para Bentham el foco estaba siempre puesto en el hombre. Para establecer la bondad de las acciones hay que observar en qué benefician a los hombres. Bentham llegó a rechazar la teoría de los derechos humanos "en cuanto que teoría", aunque estaba dispuesto a aceptar algunos derechos humanos si "en la práctica", éstos producían mayor bienestar a la sociedad. Y aquí discreparía con el concepto de "derechos de los animales", tal y como se entiende en la actualidad. Siempre deberían ir ligados al aumento del bienestar social humano.

Bentham piensa que los seres humanos son altruistas de forma espontánea y natural. Destaca las cualidades como la simpatía, la benevolencia, la amistad, la reputación, etc. que le llevan a buscar el bienestar de los demás (p. ej. ayudamos espontáneamente a una persona que tropieza y cae por una escalera). Y en este sentido, de nuevo enlazamos con nuestra relación con los animales, a los que de manera natural favoreceríamos.

La vida en sociedad exige la renuncia a ciertos placeres individuales, lo que produce un conflicto entre interés individual e interés privado. Bentham es consciente de este problema y defiende la obediencia a la ley, aun cuando pueda perjudicar al individuo, como única forma de aumentar el bienestar de la sociedad. Aquí, de nuevo nos veríamos apoyados en el concepto de una ética hacia los animales basada en la obligación legal, tal y como la establece nuestra normativa.

Problemas y críticas al utilitarismo

El utilitarismo otorga una importancia exclusiva al bienestar, lo que implica que todo puede sacrificarse en su nombre, incluso los derechos del individuo. Si usar a los hombres en experimentación en los laboratorios ayudara a salvar muchas vidas en el futuro, ¿podríamos hacerlo conforme a esta teoría?

Para el utilitarismo es difícil establecer el concepto de bienestar cuando los individuos no prefieren las mismas cosas o situaciones y además prefieren esas cosas en distintas intensidades. J.S. Mill defendió que algunos conceptos serían cualitativamente superiores aunque fueran cuantitativamente inferiores; así, los conceptos propiamente "humanos" (el conocimiento, la verdad o la justicia) podrían considerarse muy superiores a los conceptos "animales" (el disfrute del comer o beber). En este sentido, el trato justo hacia los animales podría considerarse parte del bienestar social humano.

Si lo único que importa es nuestro bienestar, podemos llevarlo al extremo que se plantea en la novela "Un mundo feliz" de Aldoux Huxley, una sociedad basada en la idea del tonto feliz. Esta novela plantea la idea de la droga perfecta (sin contraindicaciones): si lo importante es el placer que se disfruta, disfrutemos de una vida alucinada consecuencia del consumo de drogas, no hace falta que se trate de un disfrute real.

¿Seríamos felices si nos trataran igual que a un gato mimado (sin educación y teniendo un amo)?

¿Qué es mejor, ser un tonto feliz o un sabio desgraciado?

Espero, por el bien de todos, que el concepto hedonista puro no sea la guía de nuestra sociedad ni de nuestra relación con los animales.

SECAL SPCAL

XIII CONGRESO SECAL - III CONGRESSO SPCAL

I CONGRESO IBÉRICO DE CIENCIAS DEL ANIMAL DE LABORATORIO - I CONGRESSO IBÉRICO DE CIÊNCIAS DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO

New partnerships for better science



Cáceres, 18,19 y 20 de noviembre de 2015
Centro de Cirugía de Mínima Invasión "Jesús Usón"



Ponte en tu piel

Daniel Baizán Vicent

Ratones con piel humanizada que aporten unos resultados más fidedignos al estudio de las enfermedades relacionadas con la piel

Cuando uno se pone a investigar sobre una patología determinada o sobre un tipo concreto de célula o proteína, siempre va a buscar el modelo animal o celular con el que pueda obtener mejores resultados.

Actualmente, hay infinidad de modelos animales, o incluso virtuales, sobre los que centrar una investigación. Por ejemplo, el modelo de ratón transgénico en el que se suelen versar los estudios sobre el cáncer es el Fox Nude. Es un ratón inmunodeprimido que carece de pelo y permite ver el desarrollo de los tumores que se generan.

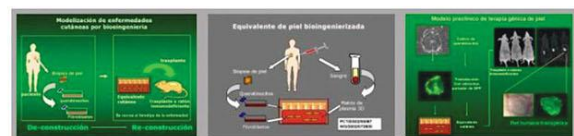
El proyecto SKINMODEL nace ante la carencia de modelos específicos para obtener resultados óptimos en las enfermedades cutáneas. Este proyecto *“se propone generar nuevos modelos de ratones mutantes con el fin de profundizar en el papel de la endoglina, podoplanina y DNA metiltransferasa 1, en la piel normal y en procesos que implican su activación y movilización, como la cicatrización de las heridas, quemaduras y el cáncer. Se plantea además el reto de producir una nueva generación de modelos preclínicos de ratón con piel humanizada para enfermedades cutáneas, como el síndrome de Gorlin, Xeroderma Pigmentoso y la Esclerosis Tuberosa”*.

En 2012, cinco investigadores españoles -Miguel Quintanilla (IIB), Fernando Larcher (CIEMAT), Ángeles Juarranz y Jesús Espada (UAM) y Pedro Jaén (Fundación Ramón y Cajal)- iniciaron este proyecto bajo la financiación del Programa de Actividades de I+D de la Comunidad de Madrid. Llevan trabajando en él desde hace tres años y, si atendemos al número de publicaciones que han generado, está siendo productivo.



En la página www.skinmodel.es encontramos las tres líneas de investigación con las que están trabajando:

- Caracterización funcional de vías de señalización que afectan a la fisiología de las células madre epidérmicas.
- Desarrollo y caracterización de modelos de enfermedades cutáneas como sistemas preclínicos de nuevos abordajes terapéuticos.



- Nuevos abordajes terapéuticos para patologías cutáneas: efecto de la TFD en la homeostasis de la piel en condiciones normales y patológicas.

Para aquellos que estéis interesados en conocer qué se realiza dentro de cada una de las líneas de investigación, no tenéis más que acceder al apartado que se encuentra en la web y ver cómo se subdividen cada uno de los puntos. Dichas divisiones aportan una pequeña síntesis sobre lo que están realizando.

Otro apartado que encontramos en la web son los recursos que cada investigador tiene para poder realizar el proyecto. Realizando una lectura transversal de los recursos de que dispone cada grupo de investigación se puede observar que existe una excelente relación entre las necesidades y los recursos, desde el animalario del IIBM hasta la Microscopía Laser Confocal del Instituto Ramón y Cajal.

Aunque la frontera del proyecto está fijada para el año 2016, el proyecto SKINMODEL se ha fijado un objetivo ulterior para poder seguir generando resultados. Esta nueva meta es un proyecto a nivel europeo **Horizon 2020**. A medio y largo plazo, están tratando de crear dicha plataforma europea que agrupe a laboratorios interesados en objetivos similares. Actualmente, ya hay investigadores de otros países que se han adherido a la red SKINMODEL. La web incluye un enlace para todo aquél investigador que esté interesado en unirse o participar.

Finalmente y, a modo de curiosidad, en la web encontramos un proyecto que aúna el arte y la ciencia. **Transracionalismo** *“es una revisión del concepto de raza desde un punto de vista actual y universal, que genera una demostración empírica y científica de la invalidez que trae consigo este término. Se realizaron extracciones de piel de distintos modelos raciales para posteriormente generar tejidos artificiales a partir de las células extraídas. El resultado: las características estructurales biológicas de estos tejidos son idénticos entre sí y no existen rasgos de apariencia como el color o la textura. La piel aquí se utiliza como elemento metafórico que, a través del Arte, reivindica la igualdad partiendo de la diferencia de los traumas culturales que cada uno traemos consigo”*.

PIEL

Tenemos aproximadamente dos metros.
Se dice que es el mayor órgano del cuerpo.
Pesa unos cinco Kilogramos.
Sin embargo, no somos conscientes de su peso, cargándolo.
Algunos son demasiado conscientes de su externalización y la protegen, lavándola constantemente, sin entender que ella sola se defiende y nos defiende.
Nadie nunca define a nadie por su piel.
Piel,
hablamos de ella cuando nos pica, cuando escuece, raras veces duele y extraño, tan expuesta.
Piel,
lo llaman estrato córneo al primero de tus niveles, un nivel muerto, ausente y ajeno.
Abandonamos capas de estos fragmentos de nuestro lienzo casa día,
descamándose en un estrato disyunto, de disyunción del cuerpo.
Por debajo, aún vivas pero en degeneración, agonizan las próximas víctimas de nuestra abierta e imperfecta presentación.
Y sin embargo, estamos ciegos sin piel.
Bajo todos esos escalones, bajo todos ellos, yace nuestro deseo.

No se apaga,
no se cierra,
no para,
no duerme.
Nos delata,
nos limita,
nos desagrada,
nos ata.
Como los ojos sin un estímulo se vuelven ciegos,
sin deseo la piel se atrofia,
se deshidrata, se extingue.
Piel,
como un velo sólo cubre los cimientos de uno mismo.
Piel,
que se enferma con el alma,
los nervios la consumen, la destrozan,
la herimos al herirse nuestro ego.
Es de lo primero que se olvida cuando uno se olvida de uno mismo.
Se repele cuando uno se repele,
se esconde del exterior,
al contacto con lo desconocido.
Piel que lleva nuestros errores,
impresos en forma de heridas.
Piel que acarrea y expone nuestros golpes,
nuestra torpeza.
No nos perdona, no nos esconde.
Nos vuelve vulnerables si demuestra que bajo una capa de espinas,
no deja ni un segundo de regenerarse,
no deja ni un segundo de vivir.

Beatriz Bañuelos Marco
Hospital Universitario La Paz

P.D. Como licencia personal, me gustaría dedicar este artículo a un compañero del centro en el que trabajo que se dejó la piel en la investigación y que se nos fue a pocos días de concluir su tesis doctoral, César Eguiluz Fernández De Valderrama.

Ligar o no ligar: That's the question

Ángela Ramos Nuez^{1,2} y Alejandro Suarez Bonnet³

¹CIBER de Enfermedades Respiratorias, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España

²Grupo Multidisciplinar de Investigación en Disfunción Multiorgánica

Unidad de Investigación Hospital Universitario Dr. Negrin, Las Palmas de Gran Canaria, España

³Instituto Universitario de Sanidad Animal

Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Arucas, España

El personal técnico del servicio de experimentación animal de un centro de investigación biomédica recibió el encargo de realizar las necropsias y recogida de muestras de algunos órganos de unas ratas pertenecientes a un nuevo proyecto. El objetivo del estudio era evaluar, en situación de daño alveolar, el potencial efecto broncodilatador de una nueva molécula. Para ello, procedieron a anestesiarse e intubar 25 ratas macho de 12 semanas de edad, que ventilaban mecánicamente, durante 4 h, con parámetros generadores de daño pulmonar (volumen inspiratorio 20 ml/kg, frecuencia respiratoria 30 resp/min y presión espiratoria al final de la espiración 3 cmH₂O). Repartieron los 25 sujetos, de manera aleatoria, en 5 grupos de estudio correspondientes a 5 dosis de la nueva molécula (10, 20, 50, 80 y 100 mg/kg). Ésta se aplicó por vía intratraqueal tras la intubación, aprovechando el mismo tubo, y antes de comenzar la ventilación. Para ello siguieron las recomendaciones de FELASA, en cuanto a volumen máximo de administración por esta vía, y nunca superaron los 30 µl.

Para finalizar, y aún bajo anestesia profunda y con el animal ventilado, procedieron a realizar una laparotomía y esternotomía media para la recogida de las muestras de órganos. De este modo, primero tomaron muestra de hígado. Luego, y con la finalidad de sacrificar al animal, procedieron a seccionar ambas aurículas. Inmediatamente, extrajeron todo el pulmón izquierdo por sección del hilo de dicho órgano y lo guardaron en N₂ líquido para su estudio proteómico y genético. Tras este paso, recogieron muestras de bazo, riñón izquierdo, timo, páncreas, duodeno, aorta abdominal, testículo izquierdo y vejiga urinaria. El último órgano que recogieron fue el pulmón derecho que, tras la sección de los troncos supraórticos y el ligamento pulmonar y de la aorta torácica, fue extraído de la cavidad torácica junto con el corazón,

traccionando la tráquea en sentido caudal y desconectándolo en ese momento del ventilador automático. Fijaron el bloque cardiopulmonar con formalina al 4% por perfusión a través de la tráquea.

A la hora de analizar los resultados histológicos, destacó, sorpresivamente, una intensa hemorragia pulmonar en todos los animales (ver Figura 1), por lo que decidieron paralizar esta línea de estudio, ya que sospecharon de un posible efecto tóxico del broncodilatador en estudio.

¿Y tú qué opinas?

¿Crees que es acertada la decisión tomada?

¿Cuál podría ser el origen de esta lesión?

¿Qué cambios propondrías en el diseño del estudio y protocolo de toma de muestras?

SOLUCIÓN

Antes de tomar una decisión definitiva de esta importancia, tendrían que haber comprobado otros aspectos como, por ejemplo, el diseño experimental y la posibilidad de que las lesiones observadas fueran debidas a causas externas a la molécula ensayada.

Si observamos con detenimiento la Figura 1 observamos que tanto los espacios alveolares como las vías bronquiales están completamente ocupados por sangre pero, curiosamente, no se observan otros signos (reacción inflamatoria, pérdidas de integridad del endotelio vascular, roturas de septos alveolares, edema...) frecuentes en hemorragias pulmonares de diferente etiología, incluidas las tóxicas.

¿Y tú qué opinas?

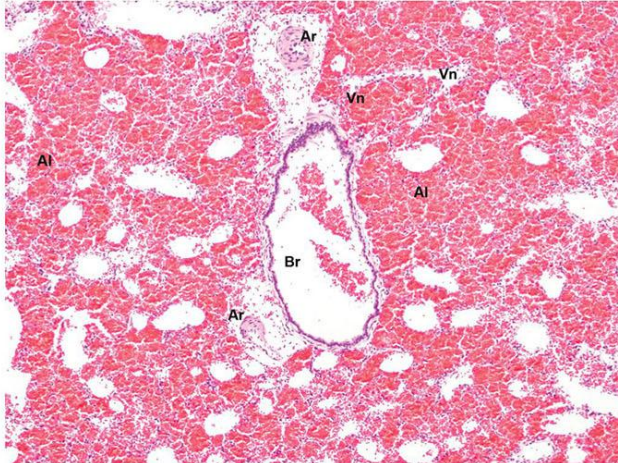


Figura 1.- Imagen histológica de pulmón derecho (hematoxilina-eosina, 20X). Se observa la práctica totalidad de los espacios alveolares (Al) ocupados por sangre, así como en el interior de los bronquiolos (Br). Se aprecia conservación tanto de las paredes arteriales (Ar) como venosas (Vn).

Un patólogo con cierta experiencia hubiese detectado rápidamente que lo que inicialmente se definió como hemorragia pulmonar no lo era, ya que no corresponde con la imagen característica (ver Figura 2). Por lo tanto, hay que buscar otras causas que justifiquen la presencia de esa sangre en el tejido pulmonar.

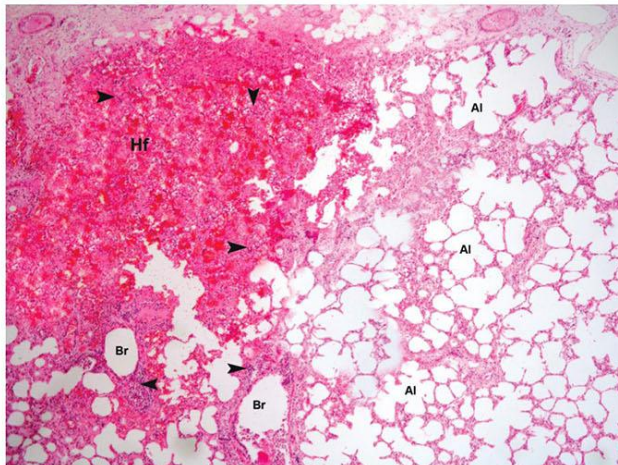


Figura 2.- Imagen histológica de pulmón (hematoxilina-eosina, 4X). Se observa hemorragia focal (Hf) subpleural de moderada severidad, asociada a infiltrados celulares inflamatorios (flechas). Se observan abundantes espacios alveolares (Al) y bronquiolos (Br) libres llenos de aire.

Si revisamos el protocolo de sacrificio y toma de muestras durante la necropsia, nos damos cuenta que extrajeron el pulmón derecho en último lugar y que, desde que seccionaron el pulmón izquierdo (que extrajeron en primer lugar para su estudio proteómico y genético, conservándolo inmediatamente en N_2), el bronquio principal de este lado quedó abierto y expuesto a la sangre procedente de la sección de las aurículas, troncos supraaórticos y aorta torácica que se acumulaba en la cavidad torácica. Dicha sangre penetró por el bronquio izquierdo que estaba seccionado muy cerca de la carina. Esta aspiración de sangre se vio facilitada, además, por los movimientos de inspiración-espriación, ya que en todo momento el pulmón derecho siguió conectado al ventilador automático, que ejerció un efecto succionador de la sangre remansada en tórax.

Una solución muy sencilla para evitar esta alteración en las muestras pulmonares consiste en tener la precaución de ligar el hilio pulmonar izquierdo antes de seccionar el pulmón de dicho lado. Se puede realizar con cualquier tipo de sutura que no presente demasiada "memoria" y que tenga un calibre aproximado de 2/0-4/0. Tras ligar la estructura, se secciona el hilio distalmente a la sutura y se retira el pulmón izquierdo (ver Figura 3). Con esta sencilla maniobra, evitamos dos consecuencias negativas fundamentales y conseguimos una buena muestra pulmonar para histología:

1. Que penetre sangre u otros fluidos en el pulmón contralateral.
2. Que se pierda aire, y por lo tanto disminución de presión inspiratoria y espiratoria durante la necropsia, con la consiguiente aparición de focos atelectásicos en el parénquima pulmonar.

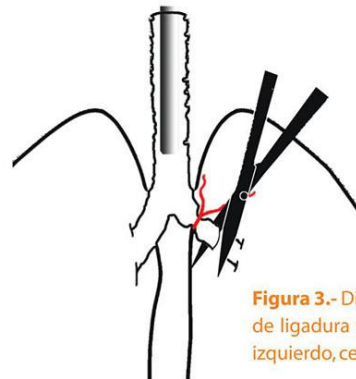


Figura 3.- Dibujo esquemático de la zona de ligadura y sección del hilio pulmonar izquierdo, cerca de la carina.

Por último, y no por ello menos importante, debemos señalar que en el diseño del estudio se ha cometido un grave error al no incorporar un grupo de animales *Sham* (animales sometidos al mismo procedimiento anestésico, manipulación, parámetros ventilatorios y protocolo de necropsia, pero sin administración de la nueva molécula en estudio). Si los investigadores lo hubiesen tenido en cuenta, hubiesen descartado que la "hemorragia" pulmonar fuera debida a la nueva molécula, ya que también habrían detectado estas lesiones en el grupo *Sham*.

BIBLIOGRAFÍA

- Villar J., Muros M., Cabrera-Benítez N.E., et al. Soluble platelet-endothelial cell adhesion molecule-1, a biomarker of ventilator-induced lung injury. Crit Care 2014, 18(2):R41. doi:10.1186/cc13754.
- Zachary J.F. and McGavin M.D. *Pathologic Basis of Veterinary Disease* (5th Edition), 2012. Elsevier, St. Louis, Missouri, USA.

25
AÑOS
1.990 - 2.015

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



sociedad española
para las ciencias
del animal de laboratorio

www.secal.es

¿Más vale solo que mal acompañado?: Evaluación del estrés en *Danio rerio*

Marta Iglesias-Julios

Champalimaud Neuroscience Programme, Fundação Champalimaud, Lisboa, Portugal

El objetivo principal de un grupo de investigadores es averiguar si se puede modelizar el comportamiento bajo estrés en larva de *Danio rerio*. Para ello han empleado un sistema experimental consistente en la grabación de los peces en nado libre a nivel individual en diferentes situaciones experimentales y el posterior análisis de los datos obtenidos.

Con el fin de analizar las consecuencias sobre el comportamiento del estrés a nivel individual, se llevaron a cabo experimentos con peces que, a priori, se esperaba que no tuviesen dificultades para desarrollar una respuesta ante el estrés, es decir, con un nivel basal control de cortisol. Además, se quería estudiar si el incremento de cortisol que se produce tras someter a los animales a un agente estresante es el que media el efecto del estrés sobre el comportamiento.

Tras diversos análisis cuantitativos del comportamiento de los peces grabados individualmente (usando Etho Vision XT 6), se obtuvieron medidas de la distancia total recorrida, de la velocidad y de la eficacia de la trayectoria, definida como el valor mínimo de giro en un radio por minuto (ver Figura 1).

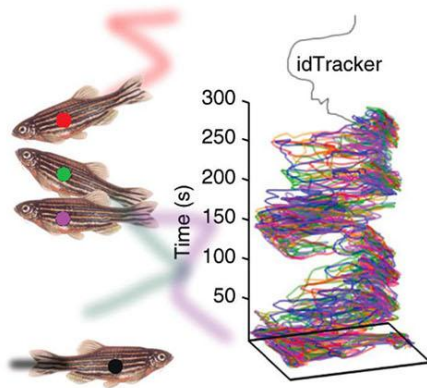


Figura 1.- Modificada de A. Pérez Escudero *et al.* Nature Methods 2014, 11:743-8.

Una vez estudiados estos valores basales por individuo, los peces se sometieron a diferentes agentes estresantes, como sostenerlos en el aire por periodos de 30 segundos. Tras aplicar el agente estresante, se calcularon los promedios de la velocidad y la eficacia de la trayectoria, y se realizó un análisis de regresión lineal que posteriormente fue utilizado para calcular el tiempo de recuperación de los niveles basales de estrés por extrapolación a los datos pre-estrés. Para la evaluación de la respuesta del cortisol en el tiempo, tras estar sometido a un agente estresante, se realizó una única medida de cortisol de cada animal mediante el uso de un ELISA estandarizado. La curva patrón se estimó en base a un modelo logarítmico, ya que las concentraciones de cortisol de los peces están ubicadas en la región de máxima pendiente de una curva sigmoidea.

¿Y tú qué opinas?

¿Observas algún problema en los parámetros analizados?

¿Qué controles crees que mejorarían la calidad del experimento?

SOLUCIÓN

Aunque existe mucha controversia sobre la edad a la que un pez comienza a tener comportamiento social, es conocido que mantenerse en grupo reduce el estrés del individuo. Sea cual sea la causa, el *social buffering* es crucial en la amortiguación de la respuesta hipotalámico-pituitaria-adrenocortical. Por tanto, en un estudio sobre estrés es poco deseable que tanto los controles como los individuos de estudio estén siendo sometidos a un estrés continuo por aislamiento social. Por ello, los resultados de estos experimentos son cuantificables pero difícilmente explicables partiendo de la base de que no se tiene un control de un comportamiento sin estrés. Además, hemos de tener en cuenta que un agente estresante sobre individuos en reposo no

causa los mismos efectos ni etológicos ni fisiológicos que el mismo agente estresante sobre una población previamente estresada.

Para eliminar el ruido en este experimento sería necesario emplear como control individuos en nado libre y en grupo. Para ello es necesario emplear un software de seguimiento capaz de identificar y devolver las trayectorias de cada individuo para poder realizar un análisis detallado posterior. Aun así, siempre existirá un rango de incertidumbre sobre el significado de estrés per se, ya que al darse comportamiento colectivo, muy posiblemente las interacciones sociales también estén produciendo un nivel mínimo de estrés.

Para vincular al cortisol con el cambio comportamental es necesario incorporar un control positivo. Por ello también sería oportuno llevar a cabo experimentos con peces que, a priori, presentasen altos niveles de cortisol basal, por ejemplo por la interrupción de la retroalimentación negativa del eje hipotálamo-hipofisario. De este modo podemos precisar si los efectos detectados en nuestros peces se relacionan con un incremento del cortisol debido al estrés (en cuyo caso el comportamiento será idéntico al de los peces con cortisol elevado) o hay factores adicionales a considerar.

Por otro lado, los parámetros escogidos para el análisis no son los adecuados para analizar el estrés del individuo. En particular, es ineficaz analizar la eficacia de la trayectoria, ya que los estudios muestran que ante el estrés los animales repiten rutas conocidas, por lo que este parámetro mejoraría. Estas medidas podrían ser enriquecidas, y así los resultados, añadiendo análisis más representativos de comportamientos generados por el estrés. La posición relativa en el setup, la distancia entre individuos, el consumo de oxígeno por minuto, son ejemplos válidos de análisis realizables para este fin.

Finalmente, sólo se tomó una medida de cortisol para analizar empleando el ELISA. De cara a evitar posibles errores de pipeteo, lo ideal es hacer dos extracciones del cortisol en cada pez (hay muestra más que suficiente) y analizar por triplicado estas dos extracciones, descartando el valor más diferente de las tres medidas llevadas a cabo.

Además, un error muy común es emplear ajustes erróneos para determinar la curva de calibración. Aun cuando esperamos que los resultados se ubiquen todos en torno al punto de inflexión de la curva, es potencialmente muy problemático ajustarlo simplemente a una función logarítmica o exponencial. En primer lugar, porque eso nos puede obligar a eliminar de la curva patrón el blanco, reduciendo el número de parámetros empleados para estimar la curva. Y, en segundo lugar, porque incrementa mucho el error de la medida conforme las medidas se alejan del punto de inflexión de la curva. Es preferible, si se carece de un software de medición específico, emplear tiempo suficiente para ajustar a los datos una curva de cuatro parámetros logísticos que asumir a priori la validez de curvas patrón más sencillas de estimar.

BIBLIOGRAFÍA

- Cyranoski D. *Solitary fish hit rock bottom*. Nature news 2010. doi:10.1038/news.2010.624.
- Egan R.J., Bergner C.L., Hart P.C., et al. *Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish*. Behav Brain Res 2009, 205(1):38-44. doi: 10.1016/j.bbr.2009.06.022.
- Hennessy M.B., Kaiser S., and Sachser N. *Social buffering of the stress response: diversity, mechanisms, and functions*. Front Neuroendocrinol 2009, 30(4):470-82. doi: 10.1016/j.yfrne.2009.06.001.
- Pérez-Escudero A., Vicente-Page J., Hinz R.C., et al. *idTracker: tracking individuals in a group by automatic identification of unmarked animals*. Nat Methods 2014, 11(7):743-8. doi: 10.1038/nmeth.2994.
- Plikaytis B.D., Turner S.H., Gheesling L.L., et al. *Comparisons of standard curve-fitting methods to quantitate Neisseria meningitidis group A polysaccharide antibody levels by enzyme-linked immunosorbent assay*. J Clin Microbiol 1991, 29(7):1439-46.
- Steenbergen P.J., Richardson M.K., and Champagne D.L. *The use of the zebrafish model in stress research*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2011, 35(6):1432-51. doi: 10.1016/j.pnpbp.2010.10.010.

Cuando la trazabilidad es una necesidad SOURALIT es su garantía

SOURALIT

Madera no resinosa

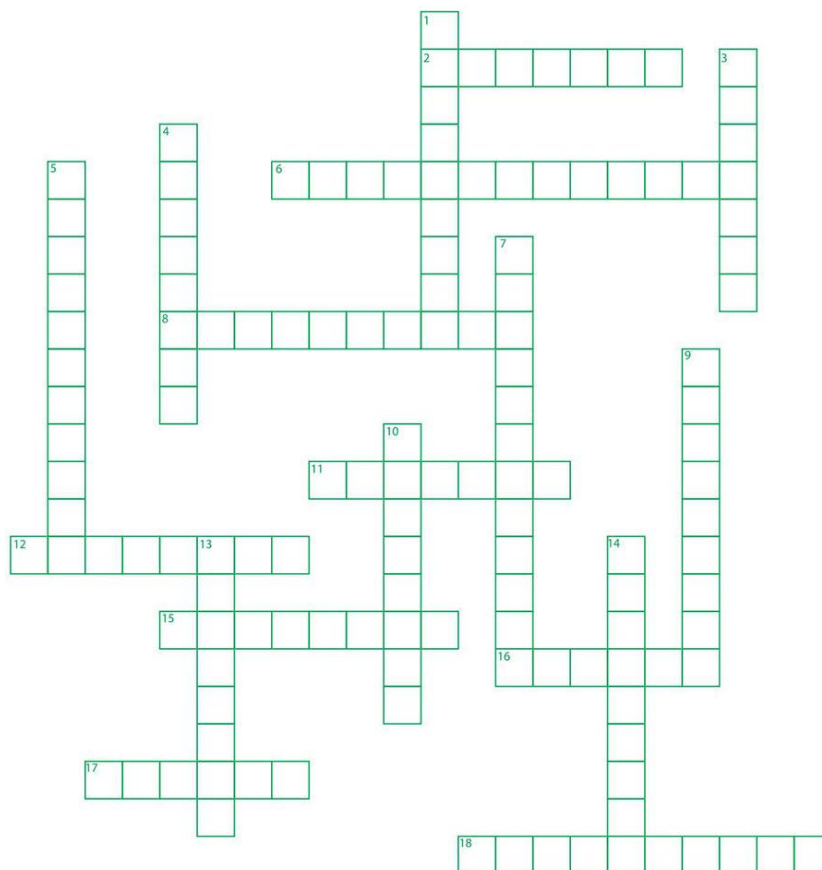
Mínima presencia de polvo

Gran capacidad de absorción

Presentaciones irradiadas envasadas al vacío

Análisis microbiológicos y físico-químicos de los lotes entregados





Horizontal

- 2. Infección e inflamación del tejido del organismo caracterizado por la hinchazón y la acumulación de pus.
- 6. Técnica de preservación de la fertilidad que consiste en la congelación ultrarápida de los óvulos para poder utilizarlos en un futuro.
- 8. Raza de conejo muy usada para la producción de anticuerpos y en la investigación inmunológica.
- 11. Organismo que alberga a otro en su interior o que lo porta sobre sí.
- 12. Región de ADN no codificante que se encuentra en los extremos de los cromosomas lineales.
- 15. Cambios morfológicos indicativos de muerte celular originada por degradación enzimática.
- 16. Parte superior del oviducto donde ocurre la fertilización.
- 17. Perteneciente a la subfamilia de roedores miomorfos que incluye a ratones y ratas.
- 18. Inflamación de los párpados.

Vertical

- 1. Tumor o neoplasia maligna formada por células de origen epitelial que conservan la capacidad de producir metástasis.
- 3. Tumor epitelial benigno en el que las células forman estructuras glandulares reconocibles o derivan de un epitelio glandular.
- 4. Establecimiento que reconoce, almacena y distribuye material biológico y los datos asociados a dicho material.
- 5. Tendencias de los roedores hembra a interrumpir su embarazo después de la exposición al olor de un macho desconocido.
- 7. Condición caracterizada por un agrandamiento del cráneo originada por una acumulación anormal de líquido cefalorraquídeo dentro del sistema ventricular cerebral.
- 9. Animal utilizado específicamente con el propósito de monitorizar el estado de salud de las colonias de roedores.
- 10. Anomalía estructural cromosómica que consiste en la pérdida de uno o más nucleótidos de la secuencia de ADN de un cromosoma.
- 13. Extracción quirúrgica de una parte inútil o perjudicial al organismo, o de un cuerpo extraño.
- 14. Saco formado por la dilatación localizada de la pared de una arteria o vena.



Powering your research development



Profesionales al servicio de la investigación

Servicios integrales para Animalarios

Externalización de servicios de Animalarios

Formación de personal

Diseño de Instalaciones

Alquiler y gestión de Instalaciones

Consultoría y Asesoramiento



www.vivotecnia-ms.com



The Weight is Over.

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

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