

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

ANIMALES DE LABORATORIO

Verano 2016. Número 70

TRANSGÉNICOS

Transgénesis en animales:
las técnicas clásicas
y las novedades.

Modelo de ratón para estudiar
el cáncer de páncreas.

Modelo de biobanco de tejidos
obtenidos de animales
de experimentación con fines
de investigación biomédica.

Entrevista:
Isabel Blanco Gutiérrez
Responsable del Servicio
de Animalario del Centro
Nacional de Investigación
Oncológica.



sociedad española
para las ciencias
del animal de laboratorio



Research Models
and Services

Training courses 2016

Training Courses at BioXpert (= days)	Date (= weeknr.)
Introductory Course micro-surgery (2)	26 & 27 May (#21)
Advanced Course micro-surgery (2)	10 & 11 November (#45)
Chronic Bloodsampling Techniques (1)	T.B.D
Injection and Administration Techniques (1)	T.B.D
Telemetry in Rodents (2)	3 & 4 March (#9)
Introduction to Cryopreservation (1)	7 April (#15)
Advanced Course on Cryo and Embryotransfer (2)	7 & 8 July (#27)
Reproductive Surgery Courses (1)	27 October (#43)
Mouse Sperm Freezing (1)	8 December (#49)
Necropsy and Sampling (1)	29 September (#39)

Detailed information available at envigo.com/courses or contact secr@envigo.com

Envigo

PO Box 553, 5800 AN Venray, the Netherlands
 T +31 (0) 478 578 300 F +31 (0) 478 571 117

Envigo RMS B.V., is a Private Limited Liability Company, registered at the Chamber of Commerce in Venlo as Envigo RMS B.V.,
 No. 12036911 with its seat in Horst aan de Maas
 IBAN NL91ABNA0558496695 BIC ABNANL2A

envigo.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
Lara Sedó Cabezon

PUBLICIDAD

Amaia Enbeita
publicidad.revista@secal.es

FOTO DE PORTADA

Hernán Serna

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@sescam.jccm.es



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



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



LIBROS Y PÁGINAS WEB
Sergi Vila Bellmunt
sergivilab@gmail.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

Antonio Martínez Escandell (2013-2017)

VICEPRESIDENCIA

Teresa Rodrigo Calduch (2015-2019)

SECRETARÍA

Ángel Naranjo Pino (2013-2017)

VICESECRETARÍA

Clara Muñoz Mediavilla (2015-2019)

TESORERÍA

Carlota Largo Aramburu (2013-2017)

VICETESORERÍA

David Muñoz Valverde (2015-2019)

VOCALÍAS

Helena Paradell Trius (2015-2019)
Hernán Serna Duque (2015-2019)
José Luis Martín Barrasa (2015-2019)
Juan Rodríguez Cuesta (2013-2017)
María Reyes Panadero (2013-2017)
Noraybio (2013-2017)
Sergi Vila Bellmunt (2015-2019)

SOCIOS BENEFACTORES:

CHARLES RIVER LABORATORIES ESPAÑA, S.A.
PANLAB - HARVARD APPARATUS, S.L.U.
ENVIGO RMS SPAIN, S.L.
GRANJAS SAN BERNARDO
JANVIER LABS
BIOSIS
STERIS IBERIA, S.A.U.
SOURALIT
DINOX SL
ANADE
VESTILAB C.R.C., S.L.U.
NORAY BIOINFORMATICS, S.L.U.
ANTONIO MATACHANA S.A.
STERILTECH, S.L.
DYNAMIMED, S.L.
RETTENMAIER IBERICA, S.L. Y CIA SCOM
VIVOTECNIA RESEARCH
ZONLAB GmbH
ANIMALARIA, FORMACIÓN Y GESTIÓN, S.L.
SODISPAN RESEARCH, S.L.
COL.OFI. DE VETERINARIOS DE CADIZ
TEMINOX C.B.
CENTRO DE ESTUDIOS BIOSANITARIOS, SL
FLOVIGAS, S.A.

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

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

*Una formación de calidad
para una investigación de
calidad*

*Su bienestar es nuestro
bienestar*

 sociedad española
para las ciencias
del animal de laboratorio

Con la colaboración de SECAL



Animalaria

Formación y Gestión S.L.

www.animalaria.org Tel.699921930

EDITORIAL

9 ACTUALIDAD

- Descubierta una proteína imprescindible para formar óvulos y espermatozoides.
- Un circuito neuronal borra recuerdos de forma activa.
- Descubierta la relación entre psoriasis y pérdida generalizada de masa ósea.
- Aumentar las defensas antioxidantes del organismo podría retrasar el envejecimiento.

18 ARTÍCULOS

- Transgénesis en animales: las técnicas clásicas y las novedades.
- Modelo de ratón para estudiar el cáncer de páncreas.
- Modelos murinos para el estudio de la enfermedad de Alzheimer.
- Modelo de biobanco de tejidos obtenidos de animales de experimentación con fines de investigación biomédica.

44 TÉCNICAS

- Técnica Microquirúrgica: Implantación de un catéter en vena femoral en roedores.

48 PANORAMA

- Aspectos a tener en cuenta en la Implantación de un Servicio de Cirugía Experimental.

54 ALCUIDADO

- Cuidadores en Barrera II del CNIO.

58 CONTROL SANITARIO

- ¿Qué sabemos de *Helicobacter spp.*?

62 ENTREVISTA

- Isabel Blanco Gutiérrez.

64 CRUSECAL 70

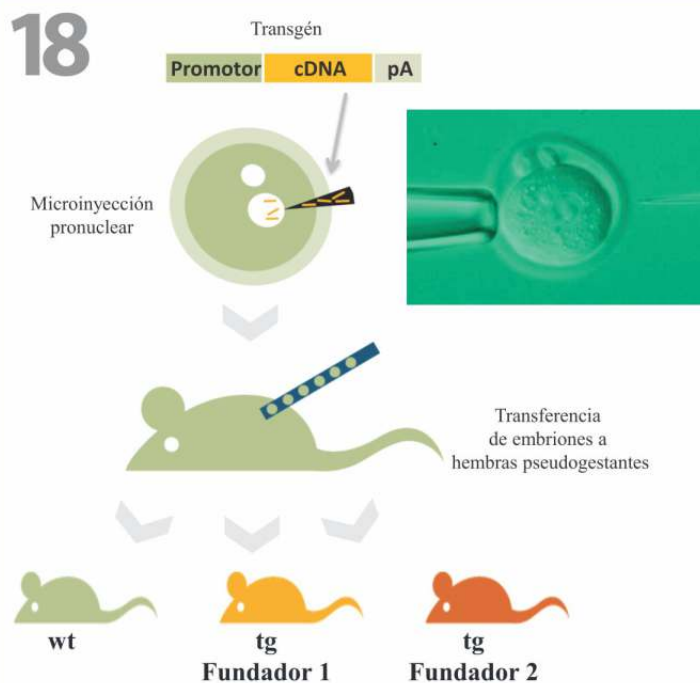




Foto: shutterstock

Un modelo al lado de los humanos

EL ANÁLISIS DE LA PIEL, MUSCULATURA Y CORDÓN NERVIOSO DE SUS TENTÁCULOS ESTÁ PERMITIENDO AVANZAR EN EL DESARROLLO DE PRÓTESIS BIOINSPIRADAS.

Octopus vulgaris tiene cuatro pares de brazos y dos filas de ventosas que realizan muchas funciones, incluyendo la flexión y el alargamiento. Por esta razón, y gracias a técnicas de análisis ultraestructural por microscopía electrónica, el pulpo está siendo elegido por muchos investigadores como modelo para el desarrollo de una nueva generación de robots y prótesis. Sin duda, estos nuevos sistemas están logrando aportar unas funcionalidades que mejoran la integridad social y la calidad de vida de muchos pacientes.



www.secal.es

EDITORIAL

Transgénicos

El animal de laboratorio constituye un reactivo biológico básico en la investigación biomédica. Se utilizan como modelos para la investigación y comprensión de las causas, diagnóstico y tratamiento de enfermedades que afectan a los humanos y a los animales, así como para el desarrollo, producción y control de medicamentos y alimentos.

La importancia de utilizar el modelo animal idóneo para una línea de investigación concreta ha llevado a la caracterización de multitud de cepas de diferentes especies, principalmente de ratón y rata, con objeto de elegir el mejor modelo experimental. Sin embargo, es con la ingeniería genética que la creación de nuevos modelos ha llevado al desarrollo de una gran cantidad de modelos animales modificados genéticamente y que constituyen el mejor modelo experimental en multitud de líneas de investigación biomédica.

En este número se presentan una serie de artículos en los que encontraréis una revisión sobre las técnicas de transgénesis clásicas y actuales, así como su incidencia en los modelos animales para la investigación del cáncer de páncreas y de la enfermedad de Alzheimer.

Sin embargo, la proliferación de estos modelos animales crea la necesidad de la creación de repositorios de muestras con el objetivo de intercambiar material biológico y fomentar la cooperación entre grupos de investigación. Con objeto de fomentar la formación de estos repositorios, en este número también encontraréis el documento directriz que ha realizado un Grupo de Trabajo de la SECAL para la creación de biobancos de tejidos obtenidos de animales de experimentación con fines de investigación biomédica.

Es indiscutible que además de los objetivos mencionados anteriormente, la creación de estos biobancos facilita la reducción del número de animales utilizados en investigación, uno de los principios básicos de las 3 Rs en el ámbito de la experimentación animal.

Dirección Revista SECAL





Su Colaborador para el Cuidado del Animal de Laboratorio

- Gama Completa
- Innovación Continua

Lechos

Enriquecimiento

Diets



Productos Certificados

DIN EN ISO 9001:2008 Y HACCP,
PEFC Certificado de Economía Forestal Sostenible, Cadena de Custodia y Trazabilidad,
DIN EN ISO 50001:2011 Sistema de Eficiencia Energética

LIGNOCEL®

ARBOCEL®

RETENMAIER IBÉRICA

S.L. Y CIA. S. COM.



Fibras diseñadas por la naturaleza

Una compañía del grupo JRS

Travesera de Gracia 56, 2º2ª
08006 Barcelona

► **i Póngase en contacto con nuestros expertos !**

info@jrsiberica.com • Tel: 933 262 888

Descubierta una proteína imprescindible para formar óvulos y espermatozoides

Las células sexuales, a diferencia de las células del resto del organismo, contienen la mitad de cromosomas (son haploides). En la meiosis, a partir de una célula precursora (células germinales primordiales) se obtienen durante la espermatogénesis cuatro espermatozoides, mientras que en la ovogénesis se produce un solo ovocito (los otros tres degeneran durante el proceso).

Científicos del Instituto de Investigación Biomédica (IRB Barcelona), liderados por el investigador Angel R. Nebreda, publican en *Nature Communications* que la proteína RingoA es un regulador fundamental de la meiosis, proceso de división celular por el que se producen óvulos y espermatozoides para la reproducción sexual de mamíferos.

« Científicos españoles descubren una proteína, llamada RingoA, esencial en meiosis, proceso de división celular que da lugar a las células sexuales, y demuestran en un estudio que sin esta proteína, los ratones de ambos sexos son estériles. Los resultados del trabajo podrían servir de base para desarrollar anticonceptivos masculinos. »

Los ratones sin RingoA obtenidos en el Laboratorio de Señalización y Ciclo Celular de Nebreda, están aparentemente sanos pero son completamente estériles, tanto machos como hembras. Tras tres años de experimentos, los investigadores postdoctorales del IRB Barcelona, Petra Mikolcevic y Michitaka Isoda, describen los desajustes moleculares que se producen durante la meiosis debido a la falta de esta proteína.

Con el estudio, los investigadores aportan nuevos datos sobre un proceso fundamental para todas las formas de vida que se reproducen sexualmente. *“Todos empezamos con una meiosis, así que saber cómo funciona es intelectualmente muy interesante”*, apunta Nebreda.

“No hay buenos modelos in vitro para estudiar la meiosis. Es difícil extraer los espermatozitos y hacer estudios en placas, hay que estudiarlos en los testículos. Y con los ovocitos todavía es peor porque en las hembras los óvulos se generan en las fases tempranas del desarrollo y trabajar con embriones es técnicamente complejo”, añade.



Los científicos han descubierto que RingoA es un activador fundamental de la proteína Cdk2, la quinasa con la que forma un complejo necesario para llevar a cabo la meiosis. De hecho, el modelo genético de ratón sin Cdk2 publicado hace 12 años por el grupo de Mariano Barbacid en el CNIO es también viable pero estéril y presenta exactamente las mismas alteraciones en meiosis que el obtenido ahora por los investigadores del IRB Barcelona.

"En biología, si obtienes dos fenotipos prácticamente indistinguibles es una indicación de que las proteínas ejercen la misma función y que pueden trabajar juntas". Lo que no se sabía hasta ahora era que la pareja fundamental de Cdk2 en meiosis era RingoA, porque Cdk2 normalmente forma complejos con otro tipo de proteínas llamadas ciclinas.

Los análisis demostraron que RingoA funciona en los telómeros, unas estructuras que protegen los extremos de los cromosomas, y donde también se localiza Cdk2. En meiosis, los telómeros actúan como anclajes para que los cromosomas se agarren a la membrana nuclear lo que permite a los cromosomas intercambiar trozos de ADN; este proceso de recombinación cromosómica es una característica esencial de la meiosis.

Sin el complejo RingoA-Cdk2, los telómeros de los cromosomas no se anclan a la membrana, están sueltos por el núcleo, la recombinación es caótica, no se reparan los cortes de ADN necesarios para intercambiar trozos y la meiosis no se puede completar. Como resultado, no se generan las células sexuales.

"No sería irrazonable pensar en desarrollar un anticonceptivo masculino basado en inhibidores para RingoA-Cdk2", propone Nebreda. *"Así como las mujeres generan los ovocitos durante el desarrollo embrionario y por lo tanto no tendría ningún sentido, los hombres producen espermatozoides durante prácticamente toda la edad adulta"*, concluye el experto.

BIBLIOGRAFÍA

- <http://www.agenciasinc.es/Noticias/Descubren-una-proteina-imprescindible-para-formar-ovulos-y-espermatozoides>
- www.irbbarcelona.org/es/news/descubren-una-proteina-imprescindible-para-formar-ovulos-y-espermatozoides
- Mikolcevic P., Isoda M., Shibuya H., et al. **Essential role of the Cdk2 activator RingoA in meiotic telomere tethering to the nuclear envelope**. Nature Communications 2016, 7:11084. DOI: 10.1038/NCOMMS11084.

Tan cerca como ellos, del personal del animalario.

Anúnciese en ANIMALES DE LABORATORIO,
la revista en habla hispana más importante
del sector y posicione sus productos
directamente en manos de los animalarios.



www.secal.es



Foto: Shutterstock

Un circuito neuronal borra recuerdos de forma activa

Científicos españoles han participado en un estudio que demuestra que existe un circuito cerebral particularmente relacionado con la eliminación de recuerdos. La investigación, realizada en gran parte con ratones manipulados genéticamente, indica que el doble mecanismo de memorización y olvido sólo tiene lugar en el momento del aprendizaje.

Aunque normalmente se asume que el cerebro es una estructura biológica diseñada para almacenar recuerdos, investigadores de la División de Neurociencias de la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla (UPO), y sendos grupos del *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) ubicados en Heidelberg (Alemania) y en Monterotondo (Italia), han demostrado que existe un circuito cerebral particularmente relacionado con el borrado de recuerdos.

« El cerebro tiene un espacio funcional limitado, así que unos aprendizajes mejoran o simplemente sustituyen a otros aprendizajes anteriores. »

Aparentemente, aprender supone establecer nuevas asociaciones entre conceptos y situaciones diferentes, así como su recuerdo a lo largo del tiempo. A este respecto, el trabajo, publicado en la revista *Nature Communications*, muestra que la información relacionada con la memoria adquirida entra en el hipocampo (parte del cerebro relacionada con estos procesos) a través de tres rutas diferentes.

Si se bloquea la ruta principal no es posible aprender, pero si el aprendizaje ya está adquirido, el bloqueo de la ruta principal no impide la reactivación de lo aprendido, aunque sí debilita este recuerdo. *“Esto quiere decir que esta inactivación produce el olvido progresivo de lo aprendido”*, explica José María Delgado, investigador de la División de Neurociencias de la UPO.

La contribución más importante de este estudio es que la debilitación u olvido progresivo de lo aprendido cuando la vía

principal está inactiva tiene lugar en una vía secundaria, que funciona en paralelo.

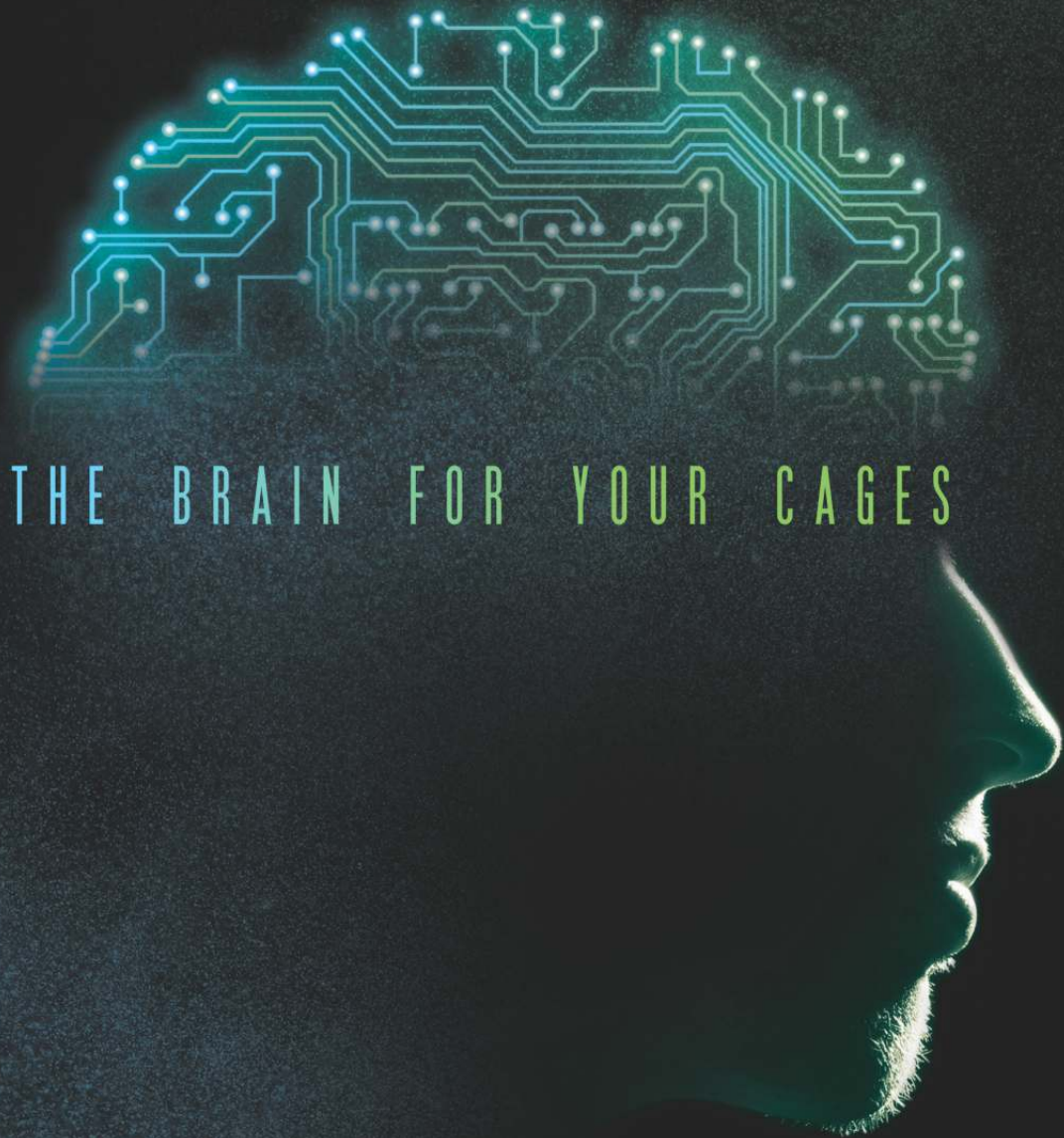
“Aunque los experimentos realizados son muy complejos, y han supuesto llevarlos a cabo durante casi cinco años, nos han llevado a la conclusión en este estudio de que este doble mecanismo de memorización y olvido solo tiene lugar en el momento del aprendizaje”, subraya Delgado, quien añade que si la vía principal de entrada de información en el hipocampo se bloquea, en ausencia de cualquier actividad identificable, no hay pérdida de memoria.

Según señala el investigador, una posible explicación a este interesante fenómeno es que el cerebro tiene un espacio funcional limitado, de manera que unos aprendizajes mejoran o simplemente sustituyen a otros aprendizajes anteriores. *“Parece pues que para aprender nuevas asociaciones y funciones puede ser necesario olvidar otras anteriores”*, apunta.

Gran parte de este estudio ha sido realizado con ratones manipulados genéticamente, lo que tiene poca aplicabilidad directa o indirecta a la clínica neurológica; pero una parte importante del mismo ha sido dedicada al desarrollo de una sustancia química capaz de activar esta ruta de olvido sin necesidad de tan complicada ingeniería genética. Esta última línea de investigación, todavía en desarrollo, permitiría, de completarse satisfactoriamente, ayudar a la eliminación de recuerdos indeseados.

BIBLIOGRAFÍA

- www.agenciasinc.es/Noticias/Un-circuito-neuronal-borra-recuerdos-de-forma-activa
- www.upo.es/diario/ciencia/2016/03/demuestran-la-existencia-de-un-mecanismo-neuronal-capaz-de-eliminar-memorias-de-forma-activa/
- Madroñal N., Delgado García J.M., Fernández Guizán A., et al. **Rapid erasure of hippocampal memory following inhibition of dentate gyrus granule cells.** *Nature Communications* 2016, 7:10923. DOI: 10.1038/ncomms10923.



THE BRAIN FOR YOUR CAGES

Living in the Digital Cage.
Technology to transform cage data collection into improved animal care!

DVC™ is a Tecniplast trademark.



Find more on www.tecniplast.it

Descubierta la relación entre psoriasis y pérdida generalizada de masa ósea

Un estudio ha relacionado por primera vez la psoriasis con el riesgo de pérdida generalizada de masa ósea y que podría tener implicaciones en otras enfermedades autoinmunes, como la enfermedad intestinal inflamatoria.

Científicos del Grupo de Genes, Desarrollo y Enfermedad que dirige Erwin Wagner en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) han descubierto que los pacientes de psoriasis experimentan una pérdida de masa ósea generalizada a consecuencia de la enfermedad.

El trabajo que publica la revista *Science Translational Medicine* describe el canal de comunicación molecular que se establece entre la piel y el hueso para provocar esta pérdida, lo que permitirá tratarla con fármacos ya comercializados o que están en fases avanzadas de ensayos clínicos.

«La psoriasis es un trastorno autoinmune de carácter crónico que afecta al 2% de la población mundial y a más de un millón de personas en España. Se caracteriza por la inflamación y descamación cutáneas, acompañadas de un mayor riesgo de padecer síndrome metabólico, que les predispone a patologías como obesidad, diabetes o enfermedades cardiovasculares. Ahora, los investigadores del CNIO han descubierto una nueva característica de este trastorno inflamatorio.»

“Hemos detectado que la psoriasis causa pérdida de tejido óseo de forma generalizada y progresiva”, explica Özge Uluçkan. “No se trata de una destrucción acelerada del hueso, sino que, durante el ciclo de regeneración ósea, no se forma hueso a la suficiente velocidad para renovar el que se pierde, por lo que la masa ósea de los pacientes se reduce con el tiempo”.

El estudio desvela que el proceso tiene lugar mediante un mecanismo por el que se inhibe la actividad de los osteoblastos, las células que generan matriz ósea para que los huesos crezcan durante la niñez y juventud, y se mantengan en buenas condiciones en la edad adulta.

En un estudio anterior, el equipo de Erwin Wagner había generado un modelo de ratón al que se le había retirado el gen *JunB* de los queratinocitos (células que forman la epidermis), imitando lo que ocurre en los trastornos inflamatorios cutáneos en humanos. Ahora han observado que este ratón experimenta pérdida de masa ósea.

Los investigadores comprobaron cómo las células inmunitarias de la piel de este modelo animal generaban grandes cantidades de la citocina IL-17, una proteína del sistema inmunitario que activa la inflamación celular en respuesta a daños. IL-17 viaja por el torrente sanguíneo hasta los huesos y una vez allí, actúa sobre los osteoblastos e inhibe la actividad de Wnt, una vía de señalización celular que interviene en la formación del esqueleto y que está implicada en trastornos como la



osteoporosis, la artrosis y el mieloma. Tratando a estos ratones con bloqueantes de IL-17 se recuperó la actividad normal de la vía Wnt y la formación de hueso.

Un segundo modelo de ratón al que se le había inducido la sobreexpresión de IL-17 también experimentó pérdida de masa ósea, demostrando que la desregulación de esta proteína es suficiente para producir este efecto.

Posteriormente, trabajaron sobre un centenar de muestras humanas. A través de técnicas de tomografía computarizada periférica de alta resolución (XtremeCT) - un método de imagen conocido como biopsia ósea virtual - comprobaron que una gran mayoría de los pacientes con psoriasis presentaban pérdidas de masa ósea que se correlacionaban con un incremento en sangre de la citocina IL-17.

Estas observaciones sugieren que los pacientes de psoriasis deberían ser monitorizados en función de esta pérdida de masa ósea, o de la presencia de altos niveles de estos factores en sangre.

“Tratar a los pacientes de psoriasis con agentes bloqueantes de IL-17, podría tener un efecto beneficioso sobre la pérdida de tejido óseo, a diferencia de otros compuestos que solo tratarían la inflamación cutánea”, dice Uluçkan. También se están desarrollando anticuerpos que actúan sobre la vía de señalización Wnt como terapia para la osteoporosis, y que podrían mostrar utilidad en estos casos.

Los hallazgos de este estudio también podrían tener implicaciones para otras enfermedades autoinmunes. IL-17 se ha convertido en un foco de atención para la investigación del sistema inmune. Su desregulación no sólo está relacionada con la psoriasis, sino también con otras enfermedades como la artritis reumatoide, la enfermedad intestinal inflamatoria y la esclerosis múltiple.

BIBLIOGRAFÍA

- <http://www.agenciasinc.es/Noticias/Descubierta-la-relacion-entre-psoriasis-y-perdida-generalizada-de-masa-osea>
- www.cnio.es/es/publicaciones/cientificos-del-cnio-descubren-una-relacion-entre-psoriasis-y-perdida-generalizada
- Uluçkan O., Jimenez M., Karbach S., et al. **Chronic skin inflammation leads to bone loss by IL-17-mediated inhibition of Wnt signaling in osteoblasts.** Science Translational Medicine 2016, 8(330):330ra37. DOI: 10.1126/scitranslmed.aad8996.



Aumentar las defensas antioxidantes del organismo podría retrasar el envejecimiento

Un estudio sobre el papel de los antioxidantes en la salud y la longevidad consigue, por primera vez, aumentar de forma global los mecanismos antioxidantes naturales de las células y apunta el uso de fármacos relacionados con la vitamina B3 como posibles vías para retrasar el envejecimiento y las enfermedades asociadas.

La progresiva acumulación de daños en las células desempeña un papel muy importante en el origen del envejecimiento. Pero hay muchos tipos de daños celulares y todavía queda por responder cuáles de ellos son los verdaderos responsables del envejecimiento y cuáles son simples daños colaterales de poca relevancia.

La hipótesis oxidativa del envejecimiento (también conocida como hipótesis de los radicales libres) se formuló en 1956 por Denham Harman. Desde entonces, la gran mayoría de intentos por demostrar que el daño oxidativo es una de las causas que contribuye al envejecimiento han resultado fallidos, incluidos múltiples ensayos clínicos en humanos con compuestos antioxidantes.

En la actualidad muchos científicos consideran que el daño oxidativo, aunque no se cuestiona que exista, es poco relevante para el envejecimiento. Sin embargo, los recientes resultados apuntan a que la hipótesis oxidativa del envejecimiento puede no estar tan desencaminada.

« Los resultados del trabajo, indican que un aumento de G6PD, y por lo tanto del NADPH, aumenta las defensas antioxidantes naturales del organismo, protege del daño oxidativo, disminuye procesos relacionados con la edad como la resistencia a la insulina y aumenta la longevidad. »

Un grupo de científicos del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, dirigidos por Manuel Serrano, en colaboración con un grupo de la Universidad de Valencia, dirigido por José Viña, y con investigadores del IMDEA Alimentación de

Madrid, han puesto su objetivo en aumentar globalmente la actividad de todas las enzimas antioxidantes de la célula a través del incremento en los niveles del NADPH, una molécula relativamente sencilla cuya importancia es clave para las reacciones antioxidantes y que, sin embargo, hasta ahora no había sido objeto de estudio en relación al envejecimiento.

Los investigadores han utilizado una aproximación genética para aumentar los niveles de NADPH. En concreto, han generado ratones transgénicos con expresión aumentada en todo su organismo de una de las enzimas más importantes para su producción, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD).



Foto: pixabay

“Como era de esperar, las células de estos animales son más resistentes a tratamientos oxidativos artificiales altamente tóxicos, demostrando así que el incremento de G6PD realmente mejora las defensas antioxidantes”, explica Sandrina Nóbrega-Pereira, primera firmante del trabajo y actualmente investigadora en el Instituto de Medicina Molecular de la Universidad de Lisboa.

Cuando los investigadores analizaron animales transgénicos longevos, observaron que sus niveles de daño oxidativo eran menores que los de sus compañeros no transgénicos de la misma edad. También estudiaron en detalle la propensión de estos animales a desarrollar cáncer y no observaron ninguna diferencia, lo que sugiere que elevar la actividad de G6PD no tiene un efecto importante sobre el desarrollo del cáncer.

Para el equipo, la sorpresa mayúscula fue cuando midieron el proceso de envejecimiento de los ratones transgénicos: los animales con una expresión elevada de G6PD y, por lo tanto, niveles altos de NADPH, envejecían de forma más tardía, metabolizaban mejor el azúcar y tenían una mejor coordinación en sus movimientos al envejecer. Además, las hembras transgénicas vivían un 14% más que las no transgénicas, mientras que no observaron efectos significativos en la longevidad de los machos.

“Este aumento de la longevidad, aun siendo modesto, es llamativo teniendo en cuenta que hasta ahora los intentos de aumentar la longevidad manipulando las defensas antioxidantes habían fracasado”, puntualiza Pablo Fernández-Marcos, investigador del IMDEA Alimentación.

Quizás la clave esté en que los investigadores de este trabajo han potenciado todas las enzimas antioxidantes de una manera global. *“Frente a la aproximación tradicional de administrar antioxidantes que reaccionan directamente con el oxígeno, nosotros hemos estimulado el conjunto de todos los mecanismos antioxidantes naturales de las células a través de elevar G6PD y su producto, el NADPH”,* destaca Mari Carmen Gómez-Cabrera, investigadora de la Universidad de Valencia.

Con estos resultados, los autores apuntan al uso de fármacos que aumenten los niveles de NADPH como posibles herramientas para retrasar el envejecimiento en humanos y aquellas enfermedades asociadas a él como la diabetes, entre otras. Concretamente, la vitamina B3 y sus derivados son responsables de la síntesis de los precursores del NADPH y son candidatos idóneos para futuros estudios.

BIBLIOGRAFÍA

- <http://www.agenciasinc.es/Noticias/Aumentar-las-defensas-antioxidantes-del-organismo-podria-retrasar-el-envejecimiento>
- Nóbrega-Pereira S., Fernández-Marcos P.J., Brioché T., et al. **G6PD protects from oxidative damage and improves healthspan in mice.** Nature Communications 2016, 7:10894. DOI: 10.1038/ncomms10894.



**ALREDEDOR DE 400 SOCIOS
RELACIONADOS CON EL SECTOR
DE LOS ANIMALARIOS**

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

publicidad.revista@secal.es



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



Transgénesis en animales: las técnicas clásicas y las novedades

Anna Pujol

Unidad de Animales Transgénicos (UAT), Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica (CBATEG), Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)

La combinación de tecnología de ingeniería genética con técnicas de reproducción asistida permitió, a inicios de los 80, el desarrollo de los primeros ratones transgénicos. Desde entonces, los animales modificados genéticamente han representado una herramienta clave para estudios de biotecnología y biomedicina. Estos modelos han permitido obtener importantes resultados en el análisis de función de genes y de secuencias de regulación de la expresión génica, en la obtención de modelos animales de enfermedades humanas en los que ensayar terapias farmacológicas y nuevas aproximaciones de terapias génicas y también en producción animal, habiendo sido aprobado el primer animal transgénico para consumo humano [1].

Se han generado animales transgénicos y mutantes en múltiples especies, tanto vertebrados como invertebrados [2]. El mamífero usado por excelencia para la investigación biomédica ha sido el ratón por diversas razones: son fáciles de criar, suponen costes relativamente bajos de estabulación y sobretodo presentan una gran semejanza genética a los humanos, además de una fisiología y anatomía similares. Pero la principal razón de esta elección ha sido que las tecnologías de modificación genética, especialmente por recombinación homóloga en células madre embrionarias (células ES), se han desarrollado en ratón y son poco eficientes en otras especies.

El primer ratón transgénico que se publicó expresaba el gen de la hormona de crecimiento bajo el promotor de la metalotioneina [3]. Se generó mediante la microinyección de ADN al pronúcleo de embriones de una célula [4]. Esta tecnología se basa en que, tras la microinyección, una o varias copias de un gen externo (transgén) se insertan en un punto al azar del genoma del cigoto, resultando un animal que presenta el transgén en todas las células de su organismo, tanto somáticas como de la línea germinal (ver Figura 1). Así, a partir de los transgénicos fundadores obtenidos (F0) se pueden establecer colonias de

animales transgénicos en los que estudiar el fenotipo. El transgén está constituido principalmente por una secuencia promotora, que determina dónde, cómo y cuándo se expresará, y una secuencia codificante, normalmente el cADN del gen de interés, que determina el producto génico que se obtendrá y que será el responsable de producir un fenotipo en el animal. Se puede así conseguir la expresión o la sobre-expresión de un producto génico endógeno o de otra especie, con un patrón de expresión seleccionado. Por otro lado, esta tecnología permite también abordar la supresión parcial de la expresión de genes endógenos, a través de la reducción de sus mRNA por tecnologías como el anti-sentido [5] o el RNA de interferencia [6], obteniendo los denominados animales *knockdown*.

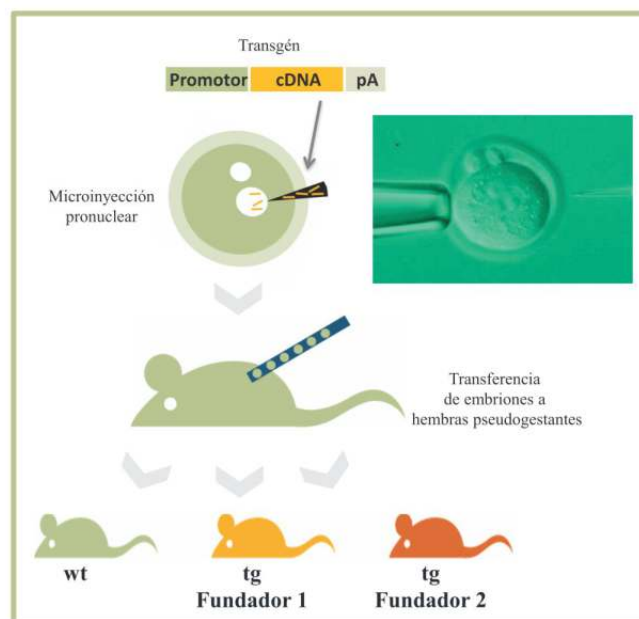


Imagen suministrada por la autoría

Figura 1. Generación de ratones transgénicos por microinyección de ADN al pronúcleo de embriones de una célula (wt: *wild type*, tg: transgénico).

Una década después, la combinación de los trabajos de Martin J. Evans en el establecimiento en cultivo de células ES de ratón [7] y los trabajos de Oliver Smithies y Mario R. Capecchi en recombinación homóloga en células eucariotas [8,9], abrieron la posibilidad de introducir mutaciones dirigidas en el genoma mediante la tecnología denominada *gene targeting*. Así se obtuvieron los primeros ratones a los que se les había inactivado un gen específico de su genoma (ratones *knockout*, KO) o a los que se les había introducido modificaciones en un locus determinado (ratones *knockin*, KI). Los modelos KO sirven para estudiar la función de un gen endógeno analizando el fenotipo del animal que presenta el gen suprimido. Los modelos KI tienen objetivos más variados, como pueden ser la introducción de mutaciones puntuales e inserciones o deleciones de interés biomédico, o estudiar el patrón de expresión de genes en los distintos tejidos o tipos celulares añadiendo a su secuencia un gen marcador como la GFP (*Green Fluorescent Protein*), o generar modelos "humanizados" substituyendo el gen murino por el homólogo humano para poder estudiar enfermedades humanas en el ratón, entre otros.

El *gene targeting* consiste en introducir una modificación en un locus concreto del genoma de las células ES con el fin de utilizar después estas células para generar un animal que presente la mutación en todas las células de su organismo (ver Figura 2A). El proceso se basa en la característica de pluripotencialidad de las células ES, es decir, la capacidad para poder generar todos los tipos celulares de un organismo, tanto células somáticas como de la línea germinal. Las células ES son capaces de mantener la pluripotencialidad incluso después de ser extraídas de la masa de células interna de un blastocisto, de ser cultivadas *in vitro* y de ser transfectadas y seleccionadas. Y cuando se reintroducen en otro blastocisto, las células ES son capaces de colonizarlo y contribuir en la formación de todos los linajes celulares del nuevo organismo, que se denomina quimera.

Para producir una modificación genética a un determinado locus del genoma de las células ES, se les introduce un vector de recombinación por electroporación. Este constructo de ADN presenta secuencias homólogas al locus genómico de interés flanqueando la mutación/modificación que se quiere introducir. Una vez dentro de las células, y aunque con poca frecuencia, se pueden producir eventos de recombinación homóloga entre el vector de recombinación externo y el locus genómico, resultando en la introducción dirigida de la mutación/modificación deseada. La incorporación de genes de selección en el vector, como el gen de resistencia a la neomicina (*neo*) y el gen de la timidina quinasa

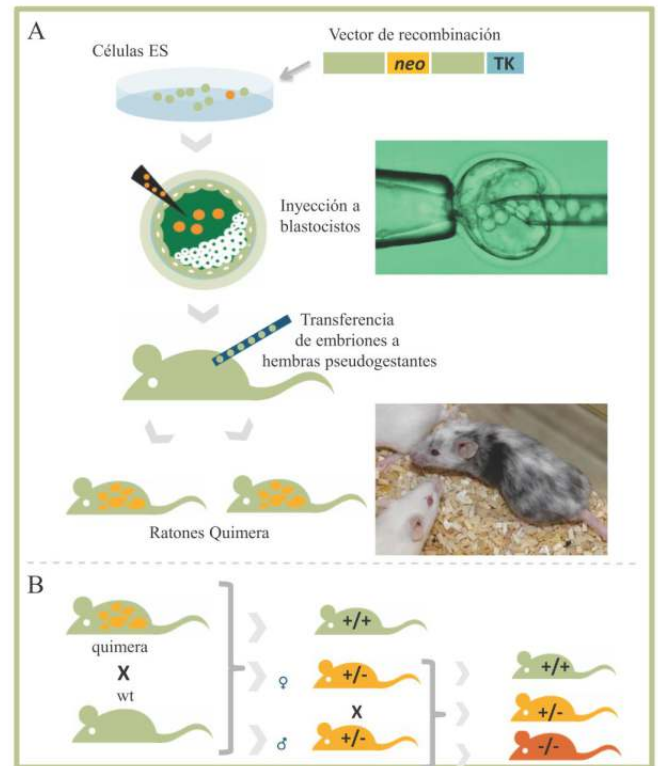


Imagen suministrada por la autoría

Figura 2.- A: Generación de ratones KO y KI constitutivos por *gene targeting* en células ES e inyección a blastocistos. **B:** Análisis de la transmisión de la mutación a la descendencia y obtención de ratones homocigotos para la mutación (+/+ *wild type*, +/- heterocigotos, -/- homocigotos).

(TK), permite la selección de los clones recombinantes basada en la resistencia a la presencia de distintas drogas (neomicina y ganciclovir). Para obtener ratones con la mutación generada en el genoma de las células ES, los clones de células ES recombinantes se inyectan en blastocistos. Estos se transfieren a hembras pseudo-gestantes y nacen ratones quimera, que se caracterizan por presentar en su organismo, además de células derivadas del blastocisto inyectado, otras derivadas de las células ES recombinantes y que contienen la mutación/modificación genética. Si la colonización se ha producido también en la línea germinal, el cruce del quimera con un ratón control permitirá transmitir a la descendencia la mutación/modificación genética dirigida y obtener animales KO/KI heterocigotos. El cruce de dos heterocigotos permite generar animales con los dos alelos del locus de interés modificado u homocigotos (ver Figura 2B).

Este proceso funciona básicamente en ratón. En otras especies animales, la dificultad de mantener la pluripotencialidad

y estabilidad genética de sus células ES en cultivo dificulta o imposibilita la generación de KO/KI mediante *gene targeting*. La alternativa era, hasta la descripción de las nucleasas dirigibles que se tratarán más adelante, la transferencia de núcleos de células somáticas a las que se había introducido la mutación, a ovocitos enucleados. Fue también por transferencia de núcleos que se obtuvo el primer mamífero clonado, la oveja Dolly [10]. Pero el proceso es complejo y poco eficaz.

Los modelos generados mediante esta tecnología son los llamados ratones KO/KI constitutivos por presentar la alteración genómica dirigida en todas las células de su organismo (somáticas y línea germinal) y durante toda su vida, ya desde la fecundación. Esto puede generar problemas de letalidad embrionaria, o fenotipos difíciles de interpretar debido a posibles adaptaciones y compensaciones del organismo frente a los efectos de la mutación introducida, o fenotipos complejos por la alteración simultánea de las distintas posibles funciones del gen en cada uno de los tejidos en los que se expresa.

Para superar estas limitaciones, se desarrollaron animales con modificaciones genéticas dirigidas restringidas a un tipo celular y/o inducibles mediante la combinación de la tecnología de recombinación homóloga en células ES y el uso de sistemas de recombinasas específicas de secuencia (ver Figura 3). Aunque existen varios, los sistemas de recombinasas más utilizados son el Cre-LoxP y el FLP-FRT [11, 12]. Están constituidos por una enzima con actividad recombinasa (Cre o FLP) que reconoce específicamente dos unidades de una secuencia de nucleótidos (LoxP o FRT) y las recombina. Cuando los dos LoxP o los dos FRT están situados con la misma orientación, el resultado de la recombinación es la delección del fragmento de ADN que flanquean. Si presentan orientación inversa, el resultado de la recombinación es la inversión del fragmento de ADN [13]. Así, para obtener un ratón KO de un gen concreto específicamente en un tejido o tipo celular o para poder inducir el KO del gen en un determinado momento de la vida del animal, se deben generar y cruzar dos tipos de ratones modificados genéticamente: a) un KI constitutivo, que presente dos secuencias LoxP en zonas intrónicas del gen a silenciar, flanqueando exones importantes para la correcta expresión del gen y b) un ratón transgénico que exprese la recombinasa Cre bajo un promotor que dirija su expresión específicamente al tejido o tipo celular donde se quiere conseguir el KO del gen de interés, o bajo un sistema inducible que permita la expresión/actividad de Cre tras la administración de un efector. Los sistemas inducibles más conocidos son el de la tetraciclina [14] y el de la Cre/ER o Cre/ERT2 [15], que utilizan como

efectores la doxicilina y el tamoxifeno respectivamente.

Con la finalidad de obtener y fenotipar ratones mutantes para todos los genes del genoma (más de 20.000), distintas instituciones internacionales se unieron para fundar el *International Mouse Phenotyping Consortium* (IMPC). El consorcio pone a disposición de toda la comunidad científica los vectores de recombinación, células ES recombinantes y modelos de ratones KO que van obteniendo, así como los resultados de análisis de fenotipo de los modelos. Por otro lado, se han creado también otros repositorios como *The European Mouse Mutant Archive* (EMMA) para mantener y distribuir modelos de ratones modificados genéticamente, en forma de embriones o espermia congelados, y que son de gran importancia para evitar la duplicación en la generación de modelos y salvaguardar la norma de las 3Rs (reducción, reutilización y refinamiento).

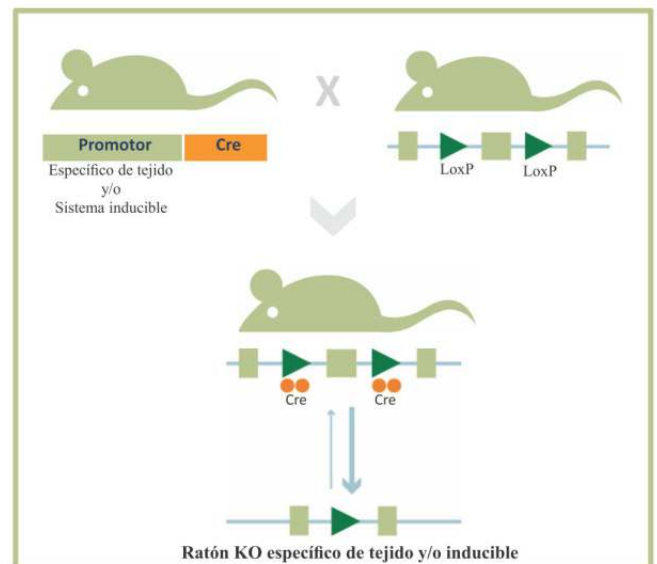


Imagen suministrada por la autoría

Figura 3.- Generación de ratones KO/KI específicos de tejido y/o inducibles.

A partir de aquí, la tecnología de generación de ratones modificados genéticamente había evolucionado poco, hasta la publicación de la posibilidad de realizar edición genómica mediante nucleasas dirigibles. Las primeras utilizadas fueron las ZFNs (*Zinc Finger Nucleasas*) y las TALENs (*Transcription Activator Like Effector Nucleasas*). Pero fue en el 2013, cuando la descripción del sistema CRISPR/Cas9 (*Clustered, Regulatory Interspaced, Short, Palindromic Repeats/ nucleasa Crispr Associated*) para la edición genómica en células eucariotas supuso realmente una nueva

revolución tecnológica en el campo de la transgénesis animal [16, 17, 18]. Desde entonces se han utilizado nucleasas para modificar genes endógenos de múltiples organismos como levadura, *Drosophila*, nematodo, gusano de seda, grillo, mariposa, erizo, pez cebra, rana, ratón, rata, conejo, cerdo, vaca, e incluso de mono, así como células humanas y murinas, tanto somáticas como células ES [19, 20].

La edición genómica mediante nucleasas dirigibles se basa en los sistemas de reparación del ADN que tienen todas las células (ver Figura 4). Las nucleasas se pueden diseñar para dirigir su actividad a secuencias concretas y precisas del genoma, donde producen un corte a la doble cadena de ADN [20]. Ante esta agresión, la célula pone en marcha todos los procesos de reparación. En la mayoría de los casos, el corte en el ADN se repara por procesos de inserciones/delecciones de nucleótidos en el punto de corte, denominados *non-homologous end joining* (NHEJ), que suelen introducir errores respecto a la secuencia original de nucleótidos, resultando en una mutación del locus o KO [21, 22]. Pero si, además de la nucleasa, se añade al sistema un vector de ADN (ADN donante), compuesto por pequeños brazos homólogos a las secuencias que flanquean el punto de corte y que rodean secuencias que incluyen modificaciones genéticas a introducir en el genoma, la célula lo utilizará para reparar el corte por Recombinación Homóloga o Reparación Dirigida por Homología (HR o HDR en inglés). Esto permite eliminar secuencias o introducir modificaciones concretas en el locus de interés, y editar así el genoma permitiendo generar animales KO y KI [23, 24].

Una de las limitaciones de las nucleasas dirigibles es la posibilidad de producir cortes y, por lo tanto, mutaciones no específicas en el resto del genoma. Por su origen bacteriano, se temía que las CRISPR/Cas9 pudieran presentar mayores niveles de actividad inespecífica, pero diversos estudios *in vivo* indican que son más precisas de lo que se esperaba [25, 26]. Además, actualmente se han descrito ya nucleasas modificadas con las que no se detecta actividad inespecífica [27].

Tanto las ZFNs como las TALENs son moléculas híbridas que combinan dominios de reconocimiento y unión al ADN, con el dominio endonucleasa FokI responsable del corte en la doble cadena del ADN. El dominio de unión al ADN de las ZFNs está formado por entre tres y seis unidades, y cada una de ellas reconoce un triplete de nucleótidos [28, 29]. En cambio, las regiones de reconocimiento de las TALENs están formadas por unidades repetidas de 33-35 aminoácidos, altamente

conservados entre las unidades, excepto los de las posiciones 12-13, que reciben el nombre de *repeat-variable di-residues* (RVD). Los RVD de cada una de las unidades repetidas de la secuencia de reconocimiento son los que confieren especificidad de unión a un determinado nucleótido [30]. El corte en la doble cadena de ADN se produce tras la dimerización de FokI. Por eso, tanto las ZFNs como las TALENs deben actuar a pares, reconociendo las secuencias a la derecha y a la izquierda del punto del ADN a cortar por la nucleasa.

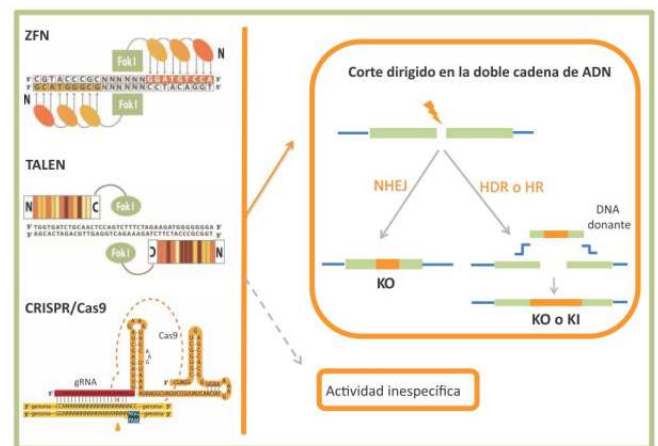


Imagen suministrada por la autoría

Figura 4.- Edición del genoma mediante nucleasas dirigibles ZFNs o TALENs, o el sistema CRISPR/Cas9 (NHEJ: *Non-Homologous End Joining*, HR: *Recombinación homóloga*, HDR: *Recombinación dirigida por homología*).

Mientras las ZFNs y los TALENs son proteínas de gran tamaño y estructura compleja, difíciles de diseñar y costosas de obtener, el sistema CRISPR/Cas9, además de eficaz y versátil, es extraordinariamente simple, lo que ha facilitado enormemente el acceso de cualquier laboratorio a la edición genómica. El sistema CRISPR/Cas9 tiene un papel clave en la inmunidad adaptativa de bacterias y arqueas contra patógenos externos como virus [31]. Fueron las científicas Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna [32] quienes las describieron como una nueva e importante herramienta para poder modificar de forma dirigida el genoma de otros organismos. Se trata de una ribonucleoproteína constituida por la endonucleasa (Cas9), que corta la doble cadena de ADN, y una molécula de ARN que incluye una secuencia guía (gRNA) de tan solo 20 nucleótidos, responsable del reconocimiento del ADN diana. Para determinar la especificidad del sistema CRISPR/Cas9 se debe diseñar sólo la secuencia gRNA. El único requerimiento es la presencia en el ADN, adyacente a la secuencia diana a cortar, de un trinucleótido 5'-NGG-3' (siendo N cualquier nucleótido) llamado PAM (*Protospacer-Adjacent Motif*),

que es reconocido por la Cas9, y por lo tanto imprescindible para la correcta interacción con el enzima. Una vez reconocida la secuencia diana, Cas9 cortará tres nucleótidos cadena arriba de la PAM [20].

En el campo de la generación de animales modificados genéticamente, la importancia de las nucleasas dirigibles, y principalmente del sistema CRISPR/Cas9, radica en su gran eficacia y sobretodo en que su actividad provoca un gran aumento de la probabilidad de eventos de recombinación homóloga en células eucariotas. Por ello posibilitan la generación de animales KO, pero también KI en un solo paso, es decir, directamente por microinyección citoplasmática/pronuclear de embriones de una célula [33, 34] o electroporación en algunos casos [35], sin la necesidad de utilizar células ES. Si el objetivo es generar un KO por NHEJ, se debe introducir en el embrión la pareja de ZFNs o TALENs en forma de ARN mensajero, o bien, en el caso del sistema CRISPR/Cas9, la Cas9 en forma de ARN mensajero o de proteína y el gRNA. Cuando el objetivo es generar un modelo KI por HR, se añade además un ADN donante.

Cabe tener en cuenta que tras la microinyección de los cigotos con las nucleasas se obtienen animales mosaico. El mosaicismo puede deberse a que la edición del genoma ocurra después de la primera división mitótica, a la convivencia entre reparación del corte del ADN por NHEJ y por HR (si es el caso) en el mismo o en diferentes blastómeros y a la posibilidad de distintas mutaciones inespecíficas. Los animales mosaico deben cruzarse para segregar las distintas mutaciones generadas y poder elegir aquellos que contienen la mutación deseada.

Aun así, la utilización de CRISPR/Cas9 supone una importante reducción en el tiempo de generación de modelos animales con mutaciones dirigidas, además de facilitar enormemente el proceso. Pero sobretodo permite la edición genómica en especies de animales distintas al ratón, en las que el *gene targeting* en células ES no era posible o poco eficaz. Además gracias a su alta eficacia y versatilidad, en el poco tiempo transcurrido desde su descripción el sistema CRISPR/Cas9 se ha utilizado para mutar varios genes o los dos alelos de un mismo gen simultáneamente [18], así como para insertar epitopos y marcadores a proteínas (*tags*), genes marcadores, o para generar alelos condicionales añadiendo dos secuencias LoxP en un solo paso [24]. También se han conseguido grandes deleciones o inserción de genes de gran tamaño en el genoma [36, 37].

Los últimos trabajos se están centrando en la obtención de

variantes de la Cas9 con nuevas propiedades como la Cas9 nickasa [38] o la SpCas9-HF1 (*High-fidelity*) [27] y en la descripción de variantes de nucleasas como la saCas9 [39] o como la Cpf1 [40], que permitan reducir la posible actividad inespecífica así como superar las limitaciones de acceso a cualquier secuencia del genoma.

Así pues, la generación de animales modificados genéticamente (KO y KI) mediante nucleasas dirigibles, y principalmente mediante el sistema CRISPR/Cas9, es mucho más fácil y eficiente que con las tecnologías clásicas y permite además la edición genética en especies hasta ahora inalcanzables, suponiendo una nueva revolución en el campo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Du S.J., et al. *Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an "all fish" chimeric growth hormone gene construct*. Biotechnology (NY) 1992,10(2):176-81.
2. Gama Sosa M.A., et al. *Animal transgenesis: an overview*. Brain Struct. & Funct. 2010,214:91-109.
3. Palmiter R.D., et al. *Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes*. Nature 1982,300:611-5.
4. Gordon J.W., et al. *Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified ADN*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 1980,77:7380-4.
5. Katsuki M., et al. *Conversion of normal behavior to shiverer by myelin basic protein antisense cADN in transgenic mice*. Science 1988,241(4865):593-5.
6. Tam O.H., et al. *Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes*. Nature 2008,453(7194):534-8.
7. Evans M.J., et al. *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. Nature 1981,292:154-6.
8. Smithies O., et al. *Insertion of ADN sequences into the human chromosomal β -globin locus by homologous recombination*. Nature 1985,317:230-4.
9. Capecchi M.R., et al. *Altering the genome by homologous recombination*. Science 1989,244(4910):1288-92.
10. Campbell K.H., et al. *Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line*. Nature 1996,380(6569):64-6.
11. Zhu X.D. and Sadowski P.D. *Selection of novel, specific single-stranded ADN sequences by Flp, a duplex-specific ADN binding protein*. Nucleic Acids Res. 1998,26(5):1329-36.

12. Nagy A. *Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring*. *Genesis* 2000,26(2):99-109.
13. Hamilton D.L. and Abremski K. *Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites*. *J Mol Biol.* 1984,178(2):481-6.
14. Gossen M., et al. *Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells*. *Science*. 1995,268(5218):1766-9.
15. Metzger D., et al. *Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995,92(15):6991-5.
16. Urnov F.D., et al. *Genome editing with engineered zinc finger nucleases*. *Nat. Rev. Genet.* 2011,11:636-46.
17. Joung J.K. and Sander J.D. *TALNs: a widely applicable technology for targeted genome editing*. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013,14:49-55.
18. Cong L., et al. *Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems*. *Science* 2013,339:819-23.
19. Niu Y., et al. *Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos*. *Cell* 2014,156:836-43.
20. Wijshak T., et al. *Endonucleases: new tools to edit the mouse genome*. *Biochim. et Biophys. Acta* 2014,10:1942-50.
21. Lieber M.R. *The mechanism of double-strand ADN break repair by the nonhomologous ADN end-joining pathway*. *Annu. Rev. Biochem.* 2010,79:181-211.
22. Geurts A.M., et al. *Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases*. *Science* 2009,325(5939):433.
23. Cui X., et al. *Targeted integration in rat and mouse embryos with zinc-finger nucleases*. *Nat. Biotechnol.* 2011,29:64-7.
24. Yang H., et al. *Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas-mediated genome engineering*. *Nature Protocols* 2014,9:1956-68.
25. Seruggia D., et al. *Functional validation of mouse tyrosinase non-coding regulatory ADN elements by CRISPR-Cas9-mediated mutagenesis*. *Nucleic acids research* 2015,43:4855-67.
26. Shen B., et al. *Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects*. *Nature methods* 2014,11:399-402.
27. Kleinstiver B.P., et al. *High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects*. *Nature* 2016,529:490-5.
28. Kim Y.G., et al. *Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996,93(3):1156-60.
29. Miller J.C., et al. *An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing*. *Nat Biotechnol.* 2007,(7):778-85.
30. Boch J., et al. *Breaking the code of ADN binding specificity of TAL-type III effectors*. *Science* 2009,326:1509-12.
31. Mojica F.J., et al. *Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements*. *J Mol Evol.* 2005,60(2):174-82.
32. Jinek M., et al. *A programmable dual-RNA-guided ADN endonuclease in adaptive bacterial immunity*. *Science* 2012,337(6096):816-21.
33. Wang H., et al. *One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering*. *Cell*. 2013,153(4):910-8.
34. Yang H., et al. *One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering*. *Cell* 2013,154(6):1370-9.
35. Hashimoto M. and Takemoto T. *Electroporation enables the efficient mRNA delivery into the mouse zygotes and facilitates CRISPR/Cas9-based genome editing*. *Sci Rep.* 2015, 5:11315.
36. Wang L., et al. *Large genomic fragment deletion and functional gene cassette knock-in via Cas9 protein mediated genome editing in one-cell rodent embryos*. *Sci Rep.* 2015, 5:17517.
37. Yoshimi K., et al. *ssODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes*. *Nat Commun.* 2016,7:10431.
38. Ran F.A., et al. *Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity*. *Cell* 2013,154(6):1380-9.
39. Friedland A.E., et al. *Characterization of Staphylococcus aureus Cas9: a smaller Cas9 for all-in-one adeno-associated virus delivery and paired nickase applications*. *Genome Biology* 2015,16:257.
40. Zetsche B., et al. *Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system*. *Cell* 2015,163(3):759-71.

Modelo de ratón para estudiar el cáncer de páncreas

M.T. Blasco, L. Martín Díaz y C. Guerra.
 Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)

El cáncer de páncreas

El adenocarcinoma pancreático ductal (PDAC) supone un 90% de los casos de cáncer de páncreas. Aunque su incidencia es baja, es la cuarta causa de muerte relacionada con el cáncer en todo el mundo, con una tasa de supervivencia a 5 años de tan sólo un 5% (Siegel *et al.*, 2014). En los últimos 10 años, los casos de cáncer de páncreas y sus tasas de mortalidad han aumentado en promedio un 0.8% y un 0.4% cada año, respectivamente (SEER Stat Fact Sheets: Pancreas Cancer, www.seer.cancer.gov), por lo que se prevé que en 2020 sea la segunda causa de muerte, sólo por detrás del cáncer de pulmón. La elevada letalidad se debe principalmente a su detección en estadios avanzados y a la resistencia a las terapias actuales. Los ensayos clínicos en cáncer de páncreas durante los últimos 20 años han dado resultados decepcionantes con poco impacto en la supervivencia de los pacientes. El uso de Gemcitabina ± nab-paclitaxel sigue siendo la terapia estándar. La supervivencia es ligeramente mayor con FOLFIRINOX, pero a costa de severos efectos secundarios. Aunque se desconoce la causa relacionada con este tipo de cáncer, se han descrito diferentes factores de riesgo como la edad, el estilo de vida, en el que destaca el tabaquismo, la predisposición genética u otras enfermedades como la pancreatitis y la diabetes, entre otras (Hidalgo, 2014).

Histología de los tumores y lesiones precursoras

Anatómicamente el páncreas exocrino está constituido por células epiteliales acinares y ductales. Las células acinares producen enzimas digestivas y el jugo pancreático, que liberan a un sistema de conductos formados por las células ductales. Se conoce que el PDAC evoluciona desde lesiones precursoras no invasivas hasta carcinomas invasivos. Entre estas lesiones preneoplásicas se diferencian histológicamente tres tipos:

neoplasia pancreática intraepitelial (PanIN), neoplasia pancreática intraductal mucinosa (IPMN) y neoplasia cística mucinosa (MCN) (Maitra *et al.*, 2005). A nivel anatomopatológico la lesión mejor caracterizada es el PanIN, que son lesiones microscópicas de tipo ductal, y que se clasifican en función del grado de displasia de menor a mayor grado en: PanIN-1A, PanIN-1B, PanIN-2 y PanIN-3 (ver Figura 1A).

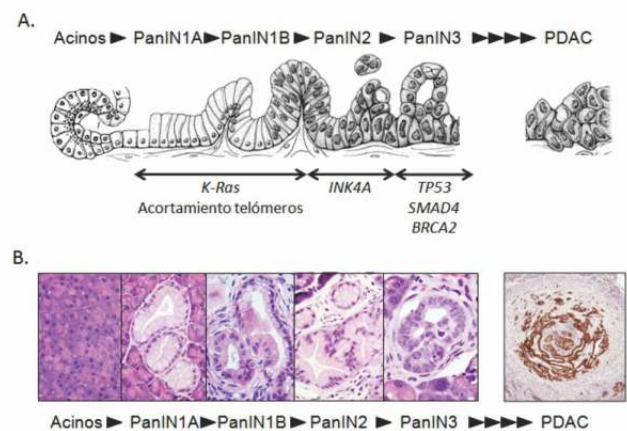


Imagen suministrada por la autoría

Figura 1. Progreso tumoral observado en PDAC. **A.** Diagrama de las lesiones que preceden el desarrollo de PanINs (modificado de Hruban *et al.*, 2005). **B.** Lesiones PanIN y PDAC observadas en el modelo de ratón *Ela-tTa;TetO-Cre;KrasLSLG12V*geo empleado en nuestro laboratorio.

Las lesiones PanIN-1A mantienen la localización basal del núcleo, mientras que las PanIN-1B tienen estructura micropapilar. Ambas presentan acúmulos de mucina, son poco proliferativas y son lesiones senescentes. Las lesiones PanIN-2 están caracterizadas por atipia nuclear, presencia de mitosis y pérdida de polaridad celular. Por último, las lesiones PanIN-3, también denominadas carcinoma *in-situ*, ya presentan características de malignidad: alta atipia nuclear, pérdida de polaridad celular, alto

número de mitosis y proliferación celular, pero sin resultar invasivas. Las lesiones PanIN2 y PanIN3 no presentan senescencia.

El origen de las lesiones PanIN, que son de naturaleza ductal, parece estar en las células acinares (Guerra *et al.*, 2007). Las células acinares se transforman en las estructuras de tipo ductal (PanIN) al expresar el oncogén *K-Ras*, pasando por una estructura intermedia conocida como metaplasia acino-ductal (ADM), que se considera el precursor directo de las lesiones de PanIN.

Los tumores PDAC se caracterizan por tener un estroma desmoplásico denso, que puede suponer hasta un 90% de la masa tumoral. Este estroma constituye un sistema complejo compuesto por diferentes tipos celulares: células del sistema inmune, células endoteliales y fibroblastos asociados al cáncer (CAFs). Los CAFs tienen un papel importante ya que producen gran cantidad de matriz extracelular, responsable de la fibrosis y de la pobre vascularización de estos tumores (Erkan *et al.*, 2012). El estroma va a actuar como una barrera física que puede impedir el paso de los quimioterapéuticos, pero también se considera un compartimento dinámico porque interactúa con las células tumorales e influye en la formación, progresión e invasión tumoral (Feig *et al.*, 2012).

Mutaciones presentes en estos tumores

Mediante el análisis genético de diferentes tumores PDAC de pacientes se ha determinado que hay hasta 12 vías de señalización y procesos alterados (Jones *et al.*, 2008). Entre las vías alteradas se encuentran *K-Ras* y otras GTPasas monoméricas, TGF- β , JNK, Wnt/Notch, Hedgehog e integrinas. Entre los procesos alterados se pueden encontrar: ciclo celular, apoptosis, reparación del DNA, invasión y adhesión. Este estudio demuestra lo extremadamente complejo y heterogéneo que son estos tumores.

Se ha descrito que los diferentes estadios de lesiones PanIN presentan muchas de las mutaciones encontradas en el PDAC, encontrándose una acumulación progresiva de alteraciones moleculares según se avanza en la secuencia de progresión tumoral de las lesiones PanIN. Así, la activación del oncogén *K-Ras*, al que se considera el evento iniciador, se detecta ya en etapas tempranas (PanIN-1). Otra alteración temprana es el acortamiento de los telómeros, lo que contribuye a la acumulación de alteraciones cromosómicas. En etapas intermedias (PanIN-2) tienen lugar mutaciones inactivantes en *INK4A*, mientras que en

etapas tardías (PanIN-3) ocurre en otros genes supresores de tumores como *TP53*, *SMAD4* y *BRCA2* (ver Figura 1A; Maitra *et al.*, 2008).

Modelos de ratón para estudiar PDAC

El desarrollo de modelos de ratón modificados genéticamente (RMGs) ha sido fundamental para comprender la biología del desarrollo tumoral y permitir el estudio de nuevas terapias (Guerra y Barbacid, 2013; Pérez-Mancera *et al.*, 2012). Estos modelos experimentales reproducen el desarrollo de las lesiones histológicas características de los tumores humanos. El primer RMG capaz de desarrollar PDAC consistía en un modelo knock-in condicional del oncogén *K-Ras*^{G12D} (Hingorani *et al.*, 2003). En este modelo, el oncogén contiene un *cassette* de parada transcripcional flanqueado por sitios LoxP (LSL-*K-Ras*^{G12D}), por lo que el alelo mutado permanece silenciado hasta que se expresa la recombinasa Cre. La expresión de la recombinasa Cre se encuentra bajo el control de promotores de genes específicos de páncreas que se expresan durante el desarrollo embrionario y que dan lugar a varios linajes celulares del páncreas: Pdx1 (Pdx1-Cre) ó Ptf1a/P48 (Ptf1-Cre) (Hruban *et al.*, 2006). En estos modelos (Pdx1-Cre; LSL-*K-Ras*^{G12D} ó Ptf1-Cre; LSL-*K-Ras*^{G12D}) se expresa el oncogén desde estadios muy tempranos del desarrollo embrionario en todas las estirpes celulares del páncreas, dando lugar al desarrollo de lesiones PanIN y posteriormente, en un alto porcentaje, al desarrollo de PDAC alrededor del año de vida de los ratones.

Las lesiones PanIN humanas progresan a PDAC debido tanto a alteraciones epigenéticas como genéticas, incluyendo inactivaciones o mutaciones en *CDKN2A/P16INK4a* y *TP53*. Los modelos de ratón que expresan de manera condicional el oncogén *K-Ras* en el páncreas junto con la pérdida mono o bialélica de *p16Ink4a/p19Arf* (Aguirre *et al.*, 2003) y *p53* (Bardeesy *et al.*, 2006) desarrollan PDAC y metastásis. Estos PDAC presentan características histológicas diferentes (tumores bien diferenciados, poco diferenciados o sarcomatoides) dependiendo de los genes que se inactiven.

El modelo desarrollado en nuestro laboratorio (Elas-tTA; TetO-Cre; *K-Ras*^{LSL^{G12V}geo}), al igual que el modelo anterior, consiste en la expresión endógena del oncogén *K-Ras* con una estrategia de knock-in condicional. Sin embargo, en nuestro caso la recombinasa Cre se expresa bajo el promotor del gen de la Elastasa, que es un gen específico de las células acinares (ver Figura 2A; Guerra *et al.*, 2007). Con este modelo se demostró que la

expresión selectiva en células acinares del oncogén *K-Ras*^{G12V} desde estadios embrionarios (E16.5) producía el desarrollo de lesiones PanIN y de PDAC (ver Figura 1B) de manera similar a los RMGs con expresión ubicua del oncogén *K-Ras* en el páncreas, descritos anteriormente. Nuestro modelo de ratón identificó a las células acinares como el origen de las lesiones PanIN y del PDAC, que ocurría mediante un proceso de transdiferenciación de células acinares a ductales (ADM; Guerra *et al.*, 2007).

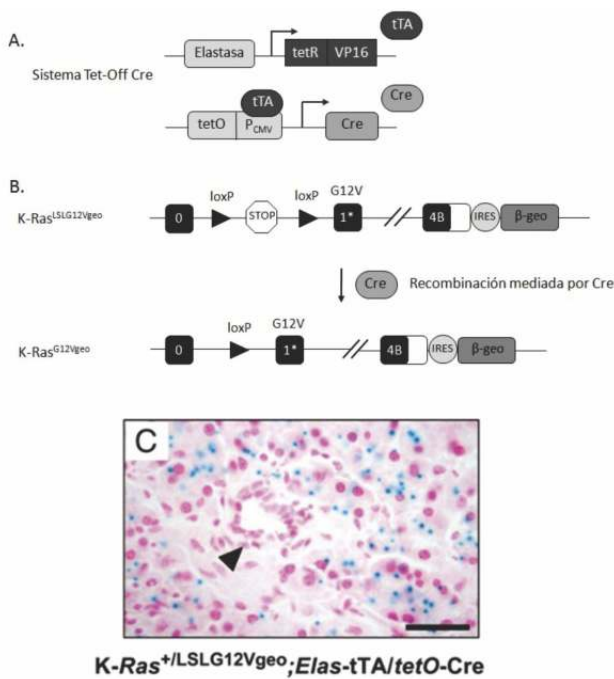


Imagen suministrada por la autoría

Figura 2. Esquema de alelos y de la expresión de los mismos controlada por la recombinasa Cre en nuestro modelo de ratón PDAC: Elast-tTA; TetO-Cre; K-Ras^{LSLG12Vgeo}. **A:** La expresión de la recombinasa Cre funciona bajo un sistema Tet-Off y sólo se expresa en ausencia de doxyciclina. **B:** La recombinasa Cre reconoce los sitios loxP (triángulos) y elimina el *cassette* de parada transcripcional (STOP), permitiendo la expresión del alelo K-Ras^{G12Vgeo}. La expresión de este oncogén puede ser seguida gracias al marcador β-geo. **C:** Tinción de la actividad β-galactosidasa (azul) como marcador de la expresión del alelo K-Ras^{G12Vgeo} en el modelo de ratón Elast-tTA; TetO-Cre; K-Ras^{LSLG12Vgeo}. La tinción queda restringida sólo a células acinares; nótese que es negativa para el ducto interlobulillar (cabeza de flecha) (escala: 20 μm).

Como se preveía, al igual que en los otros RMGs desarrollados, la adición de mutaciones en *p53* o *p16Ink4a/p19Arf* en nuestro modelo de ratón para el estudio de tumores de páncreas incrementa la penetrancia del desarrollo de PDAC al 100% y reduce significativamente la vida media de estos animales (Guerra *et al.*, 2007).

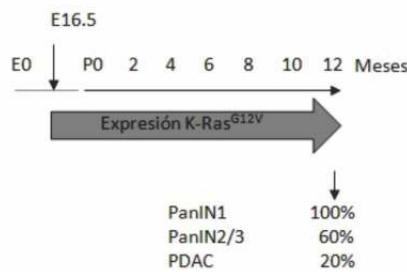
Nótese que la mutación en *K-Ras* empleada es G12V en lugar de G12D, ambas encontradas de forma frecuente en tumores humanos. Además, otra diferencia de nuestro modelo con respecto al descrito por Hingorani *et al.* es que el alelo *K-Ras*^{G12V} incorpora en la región 3'UTR un marcador de color a través del *cassette* "IRES-β-geo" (ver Figura 2B; Guerra *et al.*, 2003). Este *cassette* consiste en las secuencias que codifican para la enzima β-galactosidasa fusionada a las secuencias de un gen que confiere resistencia a neomicina. El *cassette* de resistencia a neomicina es importante durante la generación del modelo para realizar la selección de recombinantes homólogos (aquellos que incorporan las modificaciones en la zona 3' del locus de *K-Ras*) en las células ES (Mountford *et al.*, 1994). El *cassette* β-geo está precedido de secuencias IRES (sitio interno de entrada al ribosoma) que permiten la expresión y la traducción de las secuencias β-geo a partir del transcrito del alelo modificado de *K-Ras*. Así, mediante una tinción de la actividad β-galactosidasa se pueden identificar las células que expresen el oncogén *K-Ras*, aunque no muestren alteraciones morfológicas (ver Figura 2C).

Papel de la pancreatitis en el desarrollo tumoral

Otra característica importante de nuestro modelo es que la recombinasa Cre se expresa bajo una estrategia Tet-Off, lo que ofrece la posibilidad de activar/inactivar la expresión del oncogén *K-Ras* de forma controlada en el tiempo. En ausencia de doxyciclina, la recombinasa Cre se expresa en las células acinares desde el estadio embrionario E16.5, y con ello el oncogén *K-Ras*^{G12V} (ver Figura 3A). Añadiendo doxyciclina en el agua de bebida de los animales, bloqueamos la expresión de la recombinasa Cre, por lo que no se expresará el oncogén *K-Ras*. Este hecho es muy importante porque el modelo permite reproducir lo que ocurre en humanos; es decir, retrasar la expresión del oncogén *K-Ras* hasta la etapa adulta. Así, tratamos a los ratones con doxyciclina en el agua de bebida desde el cruce hasta los dos meses de edad (ver Figura 3B). En el momento de retirar la doxyciclina de la bebida, se inicia la expresión del oncogén *K-Ras*. Inesperadamente, la expresión del oncogén en la etapa adulta (a partir de los 2 meses de edad) no da lugar a la aparición de lesiones PanIN (Guerra *et al.*, 2007). Nuestros estudios mostraron que las células acinares adultas son resistentes a la transformación inducida por el oncogén *K-Ras*, incluso con la inactivación de los genes supresores de tumores *p53* y *p16Ink4a/p19Arf* (Guerra *et al.*, 2011). Sin embargo, los ratones adultos que expresan *K-Ras*^{G12V} en las células acinares, desarrollan lesiones PanIN y tumores PDAC con una alta penetrancia en el contexto de pancreatitis crónica o aguda, o

incluso cuando se exponen a eventos esporádicos de pancreatitis, por tratamiento con ceruleína, un análogo de la colecistoquinina (Guerra *et al.*, 2007; 2011).

A. PROTOCOLO EMBRIONARIO



B. PROTOCOLO ADULTO

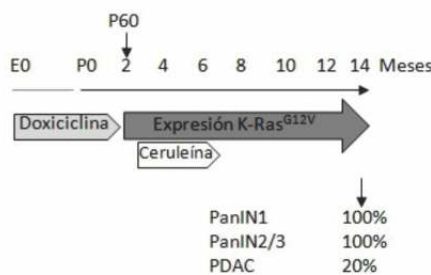


Imagen suministrada por la autoría

Figura 3. A: Protocolo embrionario. La expresión del oncogén K-Ras^{G12V} comienza en estadios embrionarios (E16.5). Todos los ratones presentan lesiones PanIN en el páncreas doce meses después del inicio de la expresión del oncogén. **B:** Protocolo adulto. Los ratones se tratan con doxiciclina desde la concepción hasta p60 (2 meses). En el protocolo adulto es necesaria la cooperación de la pancreatitis en la aparición de lesiones, por lo que tratamos a los animales desde los 3 hasta los 6 meses de edad con ceruleína. Todos los ratones sacrificados a los 14 meses de edad (12 meses tras el inicio de la expresión de K-Ras^{G12V}) presentan lesiones PanIN en el páncreas. El porcentaje indica el número de ratones con la lesión indicada.

La pancreatitis crónica es uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de PDAC en humanos (Malka *et al.*, 2002). En los modelos de ratón, la pancreatitis crónica parece ser esencial en el adulto para la aparición de lesiones PanIN y PDAC, como se indica anteriormente (Guerra *et al.*, 2007; 2011).

Como ya se ha comentado anteriormente, las células acinares que expresan el oncogén K-Ras^{G12V} son capaces de transformarse y

dar lugar a lesiones PanIN. Las lesiones PanIN de bajo grado expresan marcadores típicos de senescencia como son p16 y SABG (Guerra *et al.*, 2011), lo que implica que no progresan a estadios más agresivos. Por el contrario, las células acinares adultas son resistentes a esta transformación y para que den lugar a lesiones PanIN es necesaria la presencia de pancreatitis crónica. La pancreatitis, gracias a su efecto inflamatorio, contribuye al desarrollo y progresión de las lesiones, ya que es capaz de anular el mecanismo de senescencia inducida por oncogenes, mecanismo de defensa natural que impide la progresión de las lesiones. Episodios de pancreatitis tanto en el protocolo embrionario como en el adulto hacen que las lesiones PanIN de bajo grado pierdan la expresión de marcadores de senescencia (p16 y SABG) contribuyendo a que estas lesiones progresen a estadios más agresivos. Este proceso es reversible, ya que el tratamiento con antiinflamatorios acelera la reparación del tejido y reduce la progresión de las lesiones. Además, se ha visto que en pacientes con pancreatitis crónica que han recibido tratamiento antiinflamatorio, las lesiones PanIN expresan marcadores de senescencia. Este hecho, junto con nuestros resultados sugieren que el tratamiento antiinflamatorio en este tipo de pacientes, podría reducir el riesgo de desarrollar PDAC (Guerra *et al.*, 2011).

Estudios terapéuticos

Una de las principales opciones que ofrecen los modelos animales es la posibilidad de llevar a cabo estudios de validación de distintas dianas terapéuticas usando una aproximación genética o farmacológica en diferentes estadios del desarrollo tumoral. Actualmente, el único tratamiento aprobado para tratar tumores PDAC es la Gemcitabina, un análogo de nucleósidos que se incorpora al DNA, aprobado para pacientes con PDAC avanzado y metastásis. Con este tratamiento, el incremento en la supervivencia es mínimo: 4-5 meses en un pequeño porcentaje de pacientes que responden (Burriss *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2004). Un ensayo clínico en fase III demostró que la Gemcitabina en combinación con Erlotinib, un inhibidor de EGFR, mejoraba la respuesta de los pacientes en comparación con aquellos a los que sólo se les administraba Gemcitabina (Moore *et al.*, 2007). De hecho, estudios recientes usando modelos knock-out condicionales de EGFR (alelos floxeados de EGFR; EGFR^{lox/lox}) de ratón han demostrado que EGFR, a diferencia de lo que ocurre en tumores de pulmón y colon, es esencial para el desarrollo de tumores PDAC. Así, la delección de EGFR en células acinares desde el desarrollo embrionario impidió la aparición de lesiones PanIN, incluso en el contexto de pancreatitis crónica o en

ausencia de los genes supresores de tumores *p16Ink4A/p19Arf*. Desafortunadamente, la delección de *EGFR* no es suficiente para inhibir el desarrollo tumoral en ausencia de *p53*, aunque estos tumores se desarrollen con una latencia significativamente más larga (Ardito *et al.*, 2012; Navas *et al.*, 2012).

Futuros modelos de ratón para estudios terapéuticos

Los modelos animales utilizados hasta el momento para el estudio de PDAC no son realmente adecuados para llevar a cabo estudios de validación de dianas con interés terapéutico. Estos modelos están basados en el uso de una sola enzima recombinasa, la recombinasa Cre. Por lo que la expresión del oncogén, la inactivación de los genes supresores de tumores y la delección de la diana de interés ocurren al mismo tiempo y en las mismas células. Por lo tanto, estos estudios sólo indican la importancia de estas dianas en la iniciación del desarrollo tumoral, pero no su valor terapéutico, ya que esta estrategia no permite la eliminación de estas dianas en tumores ya establecidos.

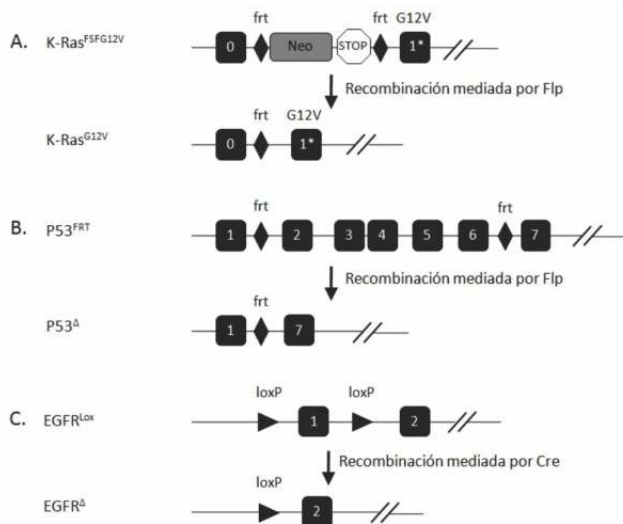


Imagen suministrada por la autoría

Figura 4. Esquema de alelos usados en el modelo terapéutico. **A:** K-Ras^{FSFG12V} y K-Ras^{G12V}. Un cassette STOP flanqueado por sitios frt precede al exón 1 mutado que contiene la sustitución de glicina por valina en el codón 12. **B:** p53^{FRT} y p53^Δ. Los exones 2-6 están flanqueados por sitios frt. **C:** EGFR^{Lox} y EGFR^Δ. El exón 1 está flanqueado por sitios loxP.

Para poder estudiar el potencial terapéutico de dianas en tumores ya desarrollados hemos creado un nuevo modelo de ratón en el que podemos separar temporal y físicamente el

desarrollo tumoral de la delección de los alelos de interés usando dos sistemas de recombinación diferentes (ver Figura 4). Este nuevo modelo, "modelo terapéutico", es también un sistema Tet-Off, que en este caso expresa la recombinasa Flp en células acinares bajo el promotor de la Elastasa (Elas-tTA; TetO-Flp). Por lo tanto, en este nuevo modelo [Elas-tTA; TetO-Flp; K-Ras^{FSFG12V}; p53^{frt/frt}], la inducción de la expresión del oncogén *K-Ras* y la inactivación de *p53* dependen de la recombinasa Flp. Para ello se han usado alelos de estos genes con las modificaciones correspondientes (secuencias de DNA flanqueadas por secuencias frt, que son las que reconoce la recombinasa Flp). El desarrollo de los tumores PDAC se puede monitorizar mediante ecografía abdominal y en el momento en el que los tumores pancreáticos presentan unas medidas establecidas se procede a la escisión de la diana terapéutica con la segunda recombinasa, la recombinasa Cre modificada (CreERT2) cuya actividad es controlada mediante tratamiento con tamoxifeno. Esta recombinasa Cre está fusionada al dominio de unión de hormonas esteroideas del receptor de estrógenos (ER) previamente modificado (ERT2) de manera que se impide su unión a los esteroides endógenos. La unión de determinados esteroides sintéticos, como el 4OH-tamoxifeno, induce un cambio conformacional en el dominio ERT2 haciendo activa la recombinasa Cre, que se traslocará al núcleo y escindirán los alelos floxeados de las dianas terapéuticas (por ejemplo *EGFR*^{Lox/Lox}). En este nuevo modelo terapéutico, la recombinasa CreERT2 se introduce como un transgén [Tg.hUBC-CreERT2] y se expresa de forma ubicua e inducible bajo el promotor humano de

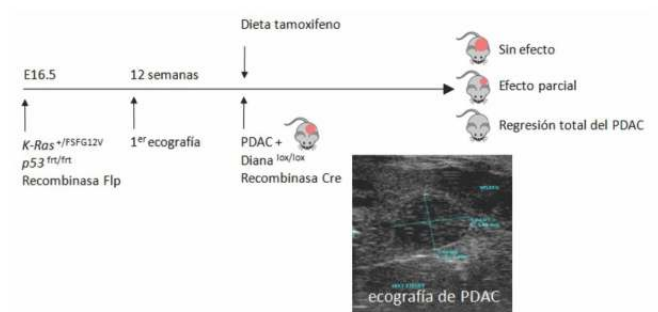


Imagen suministrada por la autoría

Figura 5. Esquema para el estudio de dianas de interés terapéutico. La expresión del oncogén comienza en estadios embrionarios (E16.5). Se realiza un seguimiento del desarrollo tumoral a partir de las 12 semanas de edad mediante ecografías. Cuando los tumores alcanzan un tamaño establecido se les administra una dieta suplementada con tamoxifeno para la activación de la recombinasa Cre. Se realiza el seguimiento de la progresión tumoral con ecografías semanales para analizar el efecto de la delección de las dianas de interés (alelo floxeado: lox/lox).

la Ubiquitina C (Ruzankina *et al.*, 2007). En este caso, se consigue la delección sistémica de los alelos floxeados tras el tratamiento con tamoxifeno. De esta forma, la administración de tamoxifeno a aquellos animales que han desarrollado PDAC resulta en la activación ubicua de la recombinasa Cre y en la recombinación eficiente de los alelos floxeados de interés terapéutico. Esta aproximación nos permite analizar el efecto de eliminar las dianas de interés en el tumor, así como en el resto del organismo y analizar los posibles efectos tóxicos que la eliminación sistémica de estos alelos pudiera llegar a producir (ver Figura 5).

Finalmente, modificaciones de este *modelo terapéutico* permitirán estudiar la función de un gen (y su valor terapéutico) en un determinado tipo celular; por ejemplo en células tumorales o en diferentes tipos celulares del estroma. Estos estudios se realizarán expresando la recombinasa Cre bajo promotores que limiten la expresión al tipo celular de interés.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre A.J., Bardeesy N., Sinha M., *et al.* Activated *Kras* and *Ink4a/Arf* deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.* 2003,17:3112-26.
- Ardito C.M., Gruner B.M., Takeuchi K.K., *et al.* EGF receptor is required for *KRAS*-induced pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell.* 2012,22:304-17.
- Bardeesy N., Cheng K.H., Berger J.H., *et al.* *Smad4* is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer. *Genes Dev.* 2006,20:3130-46.
- Burris H.A., Moore M.J., Andersen J., *et al.* Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol.* 1997,15:2403-13.
- Erkan M., Adler G., Apte M.V., *et al.* *StellaTUM*: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research. *Gut.* 2012,61:172-8.
- Feig C., Gopinathan A., Nesses A., *et al.* The pancreas cancer microenvironment. *Clin Cancer Res.* 2012,18:4266-76.
- Guerra C. and Barbacid M. Genetically engineered mouse models of pancreatic adenocarcinoma. *Mol Oncol.* 2013,7(2):232-47.
- Guerra C., Collado M., Navas C., *et al.* Pancreatitis-induced inflammation contributes to pancreatic cancer by inhibiting oncogene-induced senescence. *Cancer Cell.* 2011,19:728-39.
- Guerra C., Schuhmacher A.J., Cañamero M., *et al.* Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by *K-Ras* oncogene in adult mice. *Cancer Cell.* 2007,11(3):291-302.
- Guerra C., Mijimolle N., Dhawahir A., *et al.* Tumor induction by an endogenous *K-ras* oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell.* 2003,4:111-20.
- Hidalgo M. Pancreatic cancer. *CA Cancer J Clin.* 2014,64:9-29.
- Hingorani S.R., Petricoin E.F., Maitra A., *et al.* Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell.* 2003,4:437-50.
- Hruban R.H., Adsay N.V., Albores-Saavedra J., *et al.* Pathology of genetically engineered mouse models of pancreatic exocrine cancer: consensus report and recommendations. *Cancer Res.* 2006,66:95-106.
- Jones S., Zhang X., Parsons D.W., *et al.* Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science.* 2008,321:1801-6.
- Li D., Xie K., Wolff R., *et al.* Pancreatic cancer. *Lancet.* 2004,363:1049-57.
- Maitra A. and Hruban R.H. Pancreatic Cancer. *Annu Rev Pathol.* 2008,3:157-88.
- Maitra A., Fukushima N., Takaori K., *et al.* Precursors to invasive pancreatic cancer. *Adv Anat Pathol.* 2005,12:81-91.
- Malka D., Hammel P., Maire F., *et al.* Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis. *Gut.* 2002,51:849-52.
- Moore M.J., Goldstein D., Hamm J., *et al.* Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol.* 2007,25:1960-6.
- Mountford P., Zevnik B., Düwel A., *et al.* Dicistronic targeting constructs: reporters and modifiers of mammalian gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994,91(10):4303-7.
- Navas C., Hernandez-Porras I., Schuhmacher A.J., *et al.* EGF receptor signaling is essential for *K-ras* oncogene-driven pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell.* 2012,22:318-30.
- Pérez-Mancera P.A., Guerra C., Barbacid M., *et al.* What we have learned about pancreatic cancer from mouse models. *Gastroenterology.* 2012,142:1079-92.
- Ruzankina Y., Pinzon-Guzman C., Asare A., *et al.* Deletion of the developmentally essential gene *ATR* in adult mice leads to age-related phenotypes and stem cell loss. *Cell Stem Cell.* 2007,1:113-26.
- Siegel R., Ma J., Zou Z., *et al.* Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014,64:9-29.

Modelos murinos para el estudio de la enfermedad de Alzheimer

Ane Wyssenbach

Achucarro Basque Center for Neuroscience, CIBERNED, y Departamento de Neurociencias, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea

Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia. Es una patología cerebral irreversible que se caracteriza por una pérdida de la memoria y de las capacidades cognitivas, como consecuencia de la progresiva e irreversible pérdida neuronal. La neurodegeneración que tiene lugar durante la enfermedad sigue un patrón anatómico bastante establecido, siendo la corteza entorrinal y el hipocampo las primeras estructuras afectadas [1] y por tanto, responsables de los déficits en el aprendizaje y la formación de nueva memoria. Las causas que provocan la aparición de esta devastadora enfermedad se desconocen, aunque la edad constituye el mayor factor de riesgo. La población española es una de las poblaciones con mayor esperanza de vida del mundo y, actualmente, se calcula que unas 800.000 personas sufren la enfermedad de Alzheimer en España. A pesar del gran esfuerzo de la comunidad científica por encontrar fármacos efectivos, a día de hoy no existe cura para la EA. Por ello, los modelos animales juegan un papel primordial a la hora de estudiar los eventos iniciales que tienen lugar en la enfermedad, así como para probar la eficacia de diferentes tratamientos.

El diagnóstico definitivo de la EA se realiza *post mortem* ya que la presencia de placas seniles y de ovillos neurofibrilares confirma su diagnóstico (ver Figura 1). Las placas seniles son acúmulos de proteína β amiloide, y los ovillos neurofibrilares se forman como consecuencia de la hiperfosforilación de una proteína que está presente en los microtúbulos de las neuronas, la proteína tau. A pesar de que la etiología de esta enfermedad se desconoce, una de las principales teorías sobre su causa es la *hipótesis de la cascada amiloide*, que postula que el evento inicial que finalmente lleva a la neurodegeneración y a la demencia es el desequilibrio entre la producción y la eliminación del péptido β amiloide [2-4].

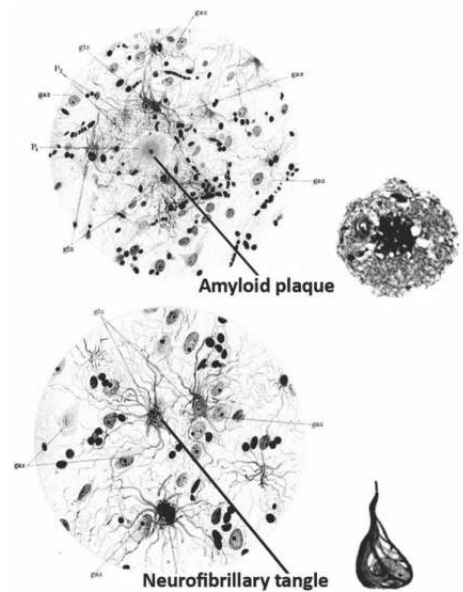


Imagen suministrada por la autoría

Figura 1.- Dibujos realizados por el Dr. Alois Alzheimer mostrando los cambios patológicos observados en un paciente, concretamente una placa amiloide (arriba) y un ovillo neurofibrilar (abajo).

Generación de placas y ovillos neurofibrilares

El péptido β amiloide ($A\beta$) se genera, en forma de monómero, a partir del procesamiento proteolítico de la proteína precursora del amiloide (APP). Esta proteína transmembrana se corta por la acción de proteasas, concretamente las α , β y secretasas. Existen dos rutas de procesamiento alternativo (ver Figura 2), siendo en la ruta amiloidogénica donde se forma el péptido $A\beta$ en forma monomérica. Este péptido, debido a su peculiar estructura, tiende a la agregación, formando oligómeros, que a su vez formarán fibrillas y protofibrillas, dando finalmente lugar a las placas.

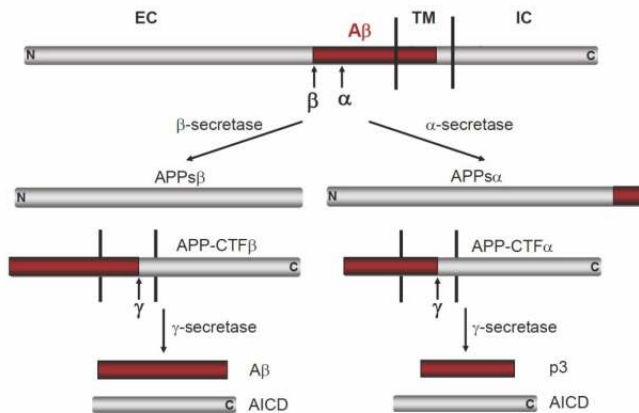


Imagen suministrada por la autoría

Figura 2.- Esquema ilustrativo del procesamiento de la APP mostrando los dos cortes alternativos que puede sufrir. La ruta amiloidogénica (izquierda) comienza con el corte de la β-secretasa mientras que la ruta no amiloidogénica (derecha) comienza con el corte de la α-secretasa. Ambas rutas son procesadas finalmente por la γ-secretasa. EC: dominio extracelular; TM: dominio transmembrana; IC: dominio intracelular; APP-CTFα/β: fragmentos carboxi terminales de la APP; Aβ: péptido β amiloide; AICD: dominio intracelular de la APP. Imagen tomada de Zheng y Koo, 2011 [5].

Por otro lado, los ovillos neurofibrilares se forman como consecuencia de la hiperfosforilación de una proteína de los microtúbulos presentes dentro de las neuronas, la proteína tau. Esta hiperfosforilación provoca una desestabilización de los microtúbulos alterando la estructura de la neurona y, como consecuencia de ello, su funcionamiento.

Mutaciones implicadas

En los últimos años se han identificado una serie de mutaciones que provocan la aparición de la EA a edades tempranas, es decir, antes de los 65. Se trata del Alzheimer Familiar y se desarrolla por la simple presencia de una serie de mutaciones que resultan suficientes para provocar las manifestaciones clínicas de la enfermedad. A pesar de constituir menos del 5 % de los casos de EA, el hallazgo de estas mutaciones y su caracterización han sido de gran utilidad a la hora de generar modelos animales que nos permitan comprender mejor los mecanismos implicados en la enfermedad. Es necesario mencionar que el Alzheimer Esporádico, cuya aparición tiene lugar a partir de los 65 años, es el más frecuente. Sin embargo, no ocurre como consecuencia de la presencia de mutaciones que directamente desarrollen la enfermedad, sino que se han identificado una serie de factores de riesgo que aumentan la probabilidad de padecerla.

Las mutaciones identificadas con la EA Familiar se corresponden con mutaciones tanto en el gen que codifica para la proteína APP (proteína precursora del amiloide) como en los genes que codifican para PSN1/PSN2 (presenilinas 1 y 2, responsables de la actividad de las secretasas), por lo tanto son mutaciones implicadas en la generación del péptido Aβ. Las mutaciones en el gen que codifica para la APP provocan un aumento de su expresión y de su actividad, lo que resulta en una mayor producción de péptido Aβ. Por otro lado, las mutaciones en los genes PSN1 y PSN2 producen un incremento de su actividad, aumentando también la producción del Aβ y causando un aumento de la formación de placas. En cuanto a los ovillos neurofibrilares, se han identificado mutaciones en el gen que codifica para la proteína tau en pacientes con demencia frontotemporal con parkinsonismo. La presencia de estas mutaciones promueve la hiperfosforilación de tau y la formación de ovillos neurofibrilares.

Modelos animales

La generación de modelos animales transgénicos con mutaciones asociadas a la EA ha supuesto una nueva era en la investigación de la enfermedad. La identificación de mutaciones asociadas a la enfermedad ha permitido generar ratones que producen tanto placas como ovillos neurofibrilares, así como pérdida sináptica, muerte neuronal y patología de las células de la glía.

Desde que se generó el primer modelo con una patología similar a la EA, con una única mutación en la APP [7], se han creado muchos modelos, tanto con mutaciones simples como dobles (ver Figura 3). Todos ellos han recapitulado con éxito la generación de placas de péptido β amiloide, mediante la sobreexpresión de la proteína APP o mediante mutaciones en la PSN1, que aceleran tanto la producción del péptido como su deposición. En paralelo, también se han desarrollado modelos animales con patología tau [8-10]. Pero lo cierto es que aunque la mayoría de los modelos han tenido éxito a la hora de desarrollar una de estas dos características histopatológicas, el simple hecho de desarrollar una no ha sido suficiente para provocar la aparición de la otra. Por este motivo, tanto para generar placas como ovillos, ha sido necesaria la introducción de múltiples transgenes en el mismo ratón, utilizando técnicas como el cruzamiento de líneas transgénicas independientes o la microinyección de proteínas patológicas en ratones con un transgen [11, 12].

Table 1 - Neuropathological features of the main transgenic mouse models of Alzheimer disease.

Mouse model	Gene (mutation)	Intraneuronal A β	Parenchymal A β plaques	Hyperphosphorylated Tau	Neurofibrillary tangles	Neuronal loss	Synaptic loss	CAA	Primary reference
PDAPP	APP (V717F)	-	Yes	Yes	No	No	Yes	-	Gamem et al. 1995
Tg2576	APP (K670N/M671L)	Yes	Yes	-	-	No	No	-	Hsiao et al. 1996
TgCRND8	APP (K670N/M671L, V717F)	-	Yes	-	No	No	-	-	Chishti et al. 2001
APP/PS1	APP (K670N/M671L), PS1 (M146L)	-	Yes	-	-	-	-	-	Holcomb et al. 1998
APP23	APP (K670N/M671L)	-	Yes	Yes	No	Little	Yes	Yes	Sturchler-Pierrat et al. 1997
Tg-SwDI	APP (E693Q, D694N)	-	Yes	-	-	-	-	Yes	Davis et al. 2004
APPDutch	APP (E693Q)	-	Little	-	-	-	-	Yes	Herrig et al. 2004
APPDutch/PS1	APP (E693Q), PS1 (G384A)	-	Yes	-	-	-	-	Little	Herrig et al. 2004
hAPP-Arc	APP (E693G, K670N/M671L, V717F)	-	Yes	-	-	-	-	Little	Cheng et al. 2004
Tg-ArcSwe	APP (E693G, K670N/M671L)	Yes	Yes	-	-	-	-	Yes	Lord et al. 2006
APP ^{arc}	APP (E693G)	-	Yes	-	-	-	-	Yes	Knobloch et al. 2007
TAPP	APP (K670N/M671L), Tau (P301L)	-	Yes	-	Yes	-	-	-	Lewis et al. 2001
3xTg-AD	APP (K670N/M671L), Tau (P301L), PS1 (M146V)	Yes	Yes	Yes	Yes	-	No	-	Oddo et al. 2003
APP _{sw} /PS1	APP (K670N/M671L, V717F), PS1 (M146L)	Yes	Yes	-	-	Yes	Yes	-	Wirhith et al. 2002
APP/PS1K1	APP (K670N/M671L, V717F), PS1 (M232T/L232P)	Yes	Yes	-	-	Yes	Yes	-	Casas et al. 2004
5xFAD	APP (K670N/M671L, I716V, V717F), PS1 (M146L/L286V)	Yes	Yes	-	-	Yes	Yes	-	Oakley et al. 2006

CAA = cerebral amyloid angiopathy; Dash (-) = not reported.

Imagen suministrada por la autoría

Figura 3.- Tabla ilustrativa de los modelos de ratón transgénico para la EA más utilizados y sus características histopatológicas más relevantes. Imagen tomada de Schaeffer y cols., 2011 [6].

Modelo triple transgénico para la EA (3xTg-AD)

De entre todos los modelos de ratón disponibles a día de hoy, el modelo más completo es el ratón triple transgénico para la EA (3xTg-AD), generado por el grupo de Frank LaFerla en el año 2003 [13]. Este modelo ha supuesto un gran avance para el estudio de la enfermedad, ya que se trata del primer modelo que desarrolla tanto placas como ovillos neurofibrilares y ha permitido estudiar la interacción entre el péptido A β y tau.

Los ratones 3xTg-AD producen más péptido A β que los ratones sanos. En etapas iniciales lo producen de manera intraneuronal, comenzando hacia los 3-4 meses en corteza y a los 6 meses en hipocampo. Este acúmulo intraneuronal de A β correlaciona con los déficits en la transmisión sináptica que estos ratones padecen, poniendo de manifiesto algunos de los efectos del péptido antes de precipitar. A partir de los 6 meses, comienzan a aparecer depósitos extracelulares de A β en forma de placas, de manera predominante en la región de la corteza y posteriormente en el hipocampo, hacia los 12 meses. En el caso de los ovillos neurofibrilares, presentan un patrón de aparición y un curso temporal distinto. Comienzan a aparecer hacia los 12 meses en hipocampo y posteriormente se expanden hacia la corteza (ver Figura 4). Estas observaciones han permitido demostrar que el péptido A β promueve y contribuye al desarrollo de la patología de tau, mientras que tau no afecta a la patología A β , corroborando la hipótesis de la cascada amiloide, en la que se postula que el evento inicial es la acumulación de péptido A β .

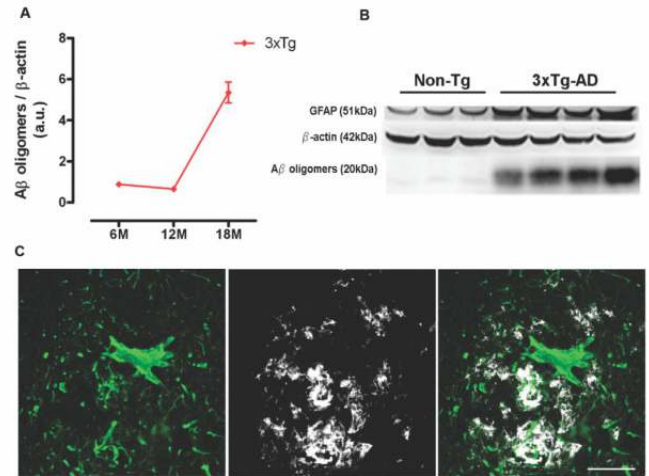


Imagen suministrada por la autoría

Figura 4.- Los ratones 3xTg-AD (A) aumentan la producción de péptido A β con la edad, los astrocitos (verde) se vuelven glióticos, (B) expresando mayores niveles de GFAP y (C) disponiéndose, con una morfología reactiva, alrededor de las placas (blanco). En nuestro laboratorio trabajamos con este modelo para estudiar el papel de los astrocitos en la EA, y más concretamente para comprender mejor cómo el péptido A β señala directamente sobre estas células y cuáles son sus consecuencias. Imagen tomada de Wyssenbach, 2015 [14]. Barra de escala = 20 μ m.

Una de las grandes ventajas que presenta este modelo es su fácil generación. A pesar de tener tres transgenes, se integran como si sólo tuviera un único transgen, ya que se ha generado microinyectando directamente dos transgenes (APP^{Swe}, tauP301L) en la línea germinal de ratones modificados genéticamente (PS1M146V). Esto ha permitido obtener una línea estable capaz de transmitir sus mutaciones a las siguientes generaciones, como si de una única mutación se tratara (ver Figura 5). Esta ventaja trae consigo la posibilidad de cruzar estos ratones con otros animales transgénicos para poder estudiar el efecto de diferentes mutaciones en el desarrollo de la patología de los ratones 3xTg-AD, así como la influencia de factores de riesgo implicados en la enfermedad (diabetes, daño cerebral, etc.). Además, los ratones hemocigotos desarrollan las características neuropatológicas, por lo que no es necesario seleccionar los animales homocigotos tras un cruce. Sin embargo, como todos los modelos animales, también presenta ciertas limitaciones. La más significativa es la ausencia de muerte neuronal en el hipocampo, evento que en la EA ocurre de manera masiva [15]. Además, tampoco presentan diferencias en la densidad de la sustancia blanca, con respecto a los ratones sanos, al contrario que en la EA [16].

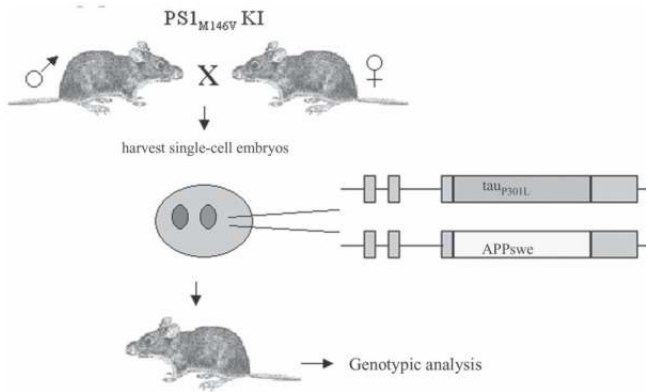


Imagen suministrada por la autoría

Figura 5.- Esquema ilustrativo de la generación del ratón 3xTg-AD. Brevemente, se microinyectaron los transgenes APPSwe y tauP301L en la línea germinal de ratones con el transgen PS1M146V. Imagen tomada y modificada de Oddo y cols., 2003 [13].

Este modelo animal ha sido de gran utilidad a la hora de probar la eficacia terapéutica de tratamientos prometedores, como la inmunización pasiva [17] y la implantación de células madre [18], resultando ambos en la disminución de los síntomas de la enfermedad de estos ratones. A pesar de que la EA aparece casi siempre en su forma esporádica, el trabajo realizado con los modelos animales con mutaciones asociadas a la enfermedad ha contribuido de manera significativa a nuestro conocimiento actual sobre la enfermedad. Aunque todos los modelos estén lejos de ser perfectos, a día de hoy son una herramienta imprescindible en la investigación de la EA.

Agradecimientos

El trabajo de nuestro laboratorio está financiado por el Centro de Investigaciones Biomédicas en Red en Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), el Ministerio de Economía y Competitividad, el Gobierno Vasco y la Univesidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea. Agradezco a los Drs. Elena Alberdi y Carlos Matute por sus sugerencias y supervisión de este manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

1. Braak H. and Braak E. *Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes.* Neurobiol Aging 1995,16:271-8.
2. Glenner C.G. and Wong C.W. *Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein.* Biochem Biophys Res Commun 1984,120:885-90.
3. Hardy J. and Allsop D. *Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease.* Trends in Pharmacological Science 1991,12:383-8.

4. Hardy J. and Selkoe D.J. *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics.* Science 2002,297:353-6.
5. Zheng H. and Koo E.H. *Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein.* Mol Neurodegener 2011,6:27.
6. Schaeffer E.L., Figueiro M., and Gatazzi W.F. *Insights into Alzheimer disease pathogenesis from studies in transgenic animal models.* Clinics 2011,66:45-54.
7. Games D., Adams D., Alessandrini R., et al. *Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta amyloid precursor protein.* Nature 1995,373:523-7.
8. Götz J., Probst A., Spillantini MG., et al. *Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform.* EMBO J 1995,14:1304-13.
9. Higuchi M., Ishihara T., Zhang B., et al. *Transgenic mouse model of tauopathies with glial pathology and nervous system degeneration.* Neuron 2002,35:433-46.
10. Lewis J., McGowan E., Rockwood J., et al. *Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein.* Nat Genet 2000,25:402-5.
11. Götz J., Chen F., van Dorpe J., et al. *Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils.* Science 2001,293:1491-5.
12. Lewis J., Dickson D.W., Lin W.L., et al. *Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP.* Science 2001,293:1487-91.
13. Oddo S., Caccamo A., Sheperd J.D., et al. *Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction.* Neuron 2003,39:409-21.
14. Wyssenbach A. Tesis doctoral: Mecanismos moleculares implicados en la astrogliosis en la enfermedad de Alzheimer. 2015.
15. Manaye K.F., Mouton P.R., Xu G., et al. *Age-related loss of noradrenergic neurons in the brains of triple transgenic mice.* Age (Dordr) 2013,35:139-47.
16. Kastyak-Ibrahim M.Z., Di Curzio D.L., Buist R., et al. *Neurofibrillary tangles and plaques are not accompanied by white matter pathology in aged triple transgenic-Alzheimer disease mice.* Magn Reson Imaging 2013,31:1515-21.
17. Oddo S., Billings L., Kesslak J.P., et al. *Abeta immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome.* Neuron 2004,43:321-32.
18. Blurton-Jones M., Kitazawa M., Martinez-Coria H., et al. *Neural stem cells improve cognition via BDNF in a transgenic model of Alzheimer disease.* Proc Natl Acad Sci USA 2009,116:13594-9.

Modelo de biobanco de tejidos obtenidos de animales de experimentación con fines de investigación biomédica

Grupo de Trabajo de la SECAL

M.A. Fortuño, A. Nieto, E. De la Cueva y L. Parra (Coordinador)

INTRODUCCIÓN

El almacenamiento de muestras biológicas, bien para su uso futuro, o bien para su intercambio con grupos o entidades pertenecientes al ámbito de la investigación biomédica es, además de un instrumento básico para el avance de la ciencia, una práctica de alto valor estratégico para la investigación “en red”. Más aún, en el caso de modelos animales, el intercambio de muestras y tejidos es una herramienta muy valiosa para conseguir uno de los objetivos contenidos en el principio de las 3 Rs. En concreto, para reducir el número de animales utilizados en investigación.

En la última década, se ha fomentado a escala internacional la formación de repositorios de muestras (“biobancos”) cuyos principales objetivos no son otros que el intercambio de material biológico y el fomento de la cooperación y la investigación en red, sobre todo en el ámbito sanitario.

Los biobancos facilitan la cooperación entre grupos de investigación, mejoran el conocimiento, en parte porque facilitan una aproximación interdisciplinar a la investigación biomédica, y además proporcionan una infraestructura a grupos de investigación a la que de otra forma no podrían acceder.

El desarrollo de biobancos nació en el ámbito de la investigación médica, en hospitales principalmente, extendiéndose en los últimos años al ámbito más general de la investigación biomédica.

Resulta obvio indicar que la existencia y el funcionamiento adecuado de un repositorio de muestras de órganos y tejidos de animales de experimentación contribuirían a la reducción en el número de animales utilizados para fines científicos. La reducción


en el número de animales es, junto al reemplazo del uso de animales y al refinamiento de los procedimientos, uno de los objetivos inspiradores del principio de las 3 Rs.

Recientemente, el Real Decreto 53/2013 que transpone la Directiva Europea 2010/63/UE relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos, dedica su artículo 8 a la “Puesta en común de órganos y tejidos”. En concreto, dicho artículo dispone que “La Administración General del Estado y los órganos competentes fomentarán, a través del comité regulado en el artículo 44, el establecimiento, entre usuarios y demás operadores, de programas para compartir órganos y tejidos. Estos programas podrán contemplar la creación de bases de datos compartidas y otras medidas de colaboración y difusión de información.”

Se puede afirmar por lo tanto que el estudio de la viabilidad de un proyecto de repositorio de muestras de órganos y tejidos de animales de experimentación es, además de un compromiso ético (principio de las 3 Rs), un deber legal (RD53/2013).

Antecedentes

Con relación a todo lo anterior, SECAL promovió la realización de una encuesta entre sus socios acerca de la viabilidad, posibles ventajas e inconvenientes, y otras cuestiones prácticas relacionadas con la implementación de una red de repositorios de muestras de animales de laboratorio. Las preguntas de que constaba dicha encuesta fueron:

 Consultas Grupo de Trabajo: Bancos de Intercambio de Órganos y Tejidos de animales de Experimentación 2013	
1. Institución	
2. Tipo de investigación	<input type="checkbox"/> Investigación básica <input type="checkbox"/> Investigación aplicada o traslacional <input type="checkbox"/> Hospital / Sanidad <input type="checkbox"/> Farmacéutica <input type="checkbox"/> Biotecnológica <input type="checkbox"/> Industria química, materiales, industrial <input type="checkbox"/> Otro tipo:
3. ¿Existe algún tipo de banco o archivo de tejidos de modelos animales en su institución?	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
4. En caso afirmativo ¿lo utiliza?	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
5. ¿Ha solicitado muestras de tejidos de modelos animales de otras instituciones o proveedores comerciales?	<input type="checkbox"/> Sí, puntualmente <input type="checkbox"/> Sí, con frecuencia <input type="checkbox"/> No
6. ¿Ha cedido, recibido o ambas cosas, muestras de tejidos de modelos animales con otras instituciones o grupos de investigación?	<input type="checkbox"/> Sí, puntualmente <input type="checkbox"/> Sí, con frecuencia <input type="checkbox"/> No
7. ¿Cree que la existencia de un biobanco de tejidos de modelos animales le sería a usted de utilidad (o a los usuarios de su animalario)?	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> NS/NC
8. Pros (marcar todos los que apliquen)	<input type="checkbox"/> Reducirá el uso de animales <input type="checkbox"/> Reducirá el envío de animales <input type="checkbox"/> Promueve el intercambio científico <input type="checkbox"/> Mejora la imagen de la experimentación con modelos animales <input type="checkbox"/> Estandarización <input type="checkbox"/> Otros, especificar:
9. Qué factores negativos tendría un biobanco de tejidos de modelos animales	<input type="checkbox"/> Financiación <input type="checkbox"/> Logísticamente inviable <input type="checkbox"/> Protección de la propiedad intelectual <input type="checkbox"/> Excesiva burocracia <input type="checkbox"/> Calidad <input type="checkbox"/> Otros, especificar:
10. ¿Qué tipo de muestras serían de interés para usted? (marcar todos los que apliquen)	<input type="checkbox"/> Estirpes establecidas (tejidos control) de roedor <input type="checkbox"/> Estirpes genéticamente modificadas <input type="checkbox"/> Roedores en general <input type="checkbox"/> Conejos <input type="checkbox"/> Grandes animales <input type="checkbox"/> Otros, especificar:
11. ¿Utilizaría este tipo de servicio?	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> Probablemente sí <input type="checkbox"/> Sí, si es gratuito <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Probablemente no <input type="checkbox"/> NS/NC
12. Comentarios/experiencias/ideas	

En total, se recibieron respuestas de 27 instituciones de investigación, en su mayoría de centros en los que se realiza investigación biomédica básica (33.9%) o investigación aplicada o traslacional (28.8%). Algunas de las instituciones albergan grupos que llevan a cabo proyectos de investigación de distinta naturaleza y cabe destacar el hecho de que se recibieron

respuestas por parte de instituciones pertenecientes al ámbito de la investigación farmacéutica (13.6%) y también biotecnológica (10.2%). De las instituciones que respondieron a la consulta, tan sólo el 14.8% cuenta en la actualidad con un banco o archivo de tejidos en su institución. Y de este pequeño porcentaje de instituciones que cuentan con dicho servicio, el 25% no lo ha utilizado. Ante la pregunta de si la institución ha solicitado alguna vez muestras de tejidos de otra institución, o de un proveedor comercial, el 25.9% lo ha hecho puntualmente; ninguna de las instituciones lo ha hecho con frecuencia. Es interesante resaltar que aunque cerca del 75% de las instituciones no han solicitado muestras de tejidos de otras instituciones (no necesariamente biobancos), la mitad de los encuestados sí ha cedido muestras de tejidos a otras instituciones o grupos de investigación. Algo más de un tercio de los que han cedido muestras lo hace además con cierta asiduidad.

A la pregunta de si un banco de tejidos de modelos animales sería de alguna utilidad para su animalario o para los usuarios de su animalario, la mayoría (85.2%) respondió que sí y tan sólo el 7.4% estima que la existencia de este banco no le sería de ninguna utilidad.

Uno de los aspectos más interesantes de la encuesta es la valoración de las ventajas que la existencia de un biobanco (o una red de biobancos) aportaría, y también los inconvenientes que se perciben en su implementación y funcionamiento. Las dos ventajas que más se valoraron en la encuesta fueron que la hipotética implantación de tal servicio reduciría el número de animales utilizados (en línea con uno de los principales objetivos de la aplicación del principio de las 3 Rs), y que, en general, se mejoraría la imagen de la experimentación con modelos animales ante la sociedad.

Por otro lado, el principal inconveniente señalado por los participantes en la encuesta, quizás en línea con la coyuntura económica actual, fue la obtención de una financiación que garantice su sostenibilidad. Otros potenciales problemas derivados del mantenimiento de una calidad óptima de muestras son por una parte la burocracia que, probablemente, implicará el uso del biobanco en red y, por otra, los aspectos relacionados con la propiedad intelectual de los materiales archivados o del uso que de ellos se vaya a hacer por terceros.

El 12.5% de los encuestados señaló que, en principio y desde un punto de vista logístico, no ve viable un proyecto como el que aquí se expone.

Como cabía esperar, la mayoría de las instituciones encuestadas (79.2%) ven útil la existencia de este tipo de biobanco sobre todo para las especies de roedor más comúnmente utilizadas. Un 23.9% menciona específicamente las muestras de tejidos procedentes de ratones genéticamente modificados.

Por último, ante la pregunta de si su institución haría uso del servicio proporcionado por un biobanco de tejidos de animales de experimentación, el 17.9% de los encuestados asegura que sí lo haría, un 53.6% señala que probablemente sí haría uso de tal servicio, y un 10.7% indica que sí con la condición de que el servicio fuera gratuito. Por otro lado, un 10.7% de los encuestados reconoce que probablemente no haría uso del biobanco.

OBJETIVO

En el presente documento se han recopilado los aspectos estructurales y funcionales que debería cumplir un biobanco de órganos y tejidos obtenidos de animales de experimentación con fines de investigación biomédica, para que pueda servir como referencia a las instituciones que tengan interés en crear una unidad de este tipo.

Como se ha comentado anteriormente, la aplicación del presente documento cubre diversos objetivos, como la reducción del número de animales utilizados, la cooperación entre diversos grupos de trabajo, la mejora del conocimiento y, en algunos casos, el proporcionar una infraestructura a grupos de investigación que de otra forma no podrían acceder.

MODELOS DE ORGANIZACIÓN

Siguiendo el modelo que propone la ley para los biobancos de muestras humanas, la organización ideal de un biobanco de tejidos animales podría contemplar un diseño como el que se muestra en la Figura 1, con los siguientes elementos:

- **Titular.** Es el responsable jurídico de la actividad del biobanco, de su constitución y su funcionamiento. Normalmente debería coincidir con el titular de la institución que aloja el biobanco.
- **Comité de ética para la investigación animal** de la propia institución que debería velar porque todos los procedimientos del biobanco se ajusten a la normativa

vigente en materia de investigación con animales y a los códigos éticos que aplican.

- **Dirección Científica.** Persona responsable del diseño estratégico del Biobanco, incluyendo los siguientes aspectos: definición de colecciones de interés, revisión de procedimientos, la detección de requisitos de los usuarios, implantación y revisión de un sistema de gestión de calidad y elaboración de memorias de actividad.
- **Grupo de apoyo,** constituido por profesionales expertos en investigación con animales que asesoren al director en sus tareas de planificación estratégica y ejecutiva.
- **Coordinación técnica.** Podría coincidir o no con la dirección científica. Es la figura responsable de elaborar, supervisar y modificar los procedimientos técnicos.
- **Personal técnico,** para la ejecución de los procedimientos.
- **Especialista en anatomía patológica animal,** como personal de apoyo para aportar calidad de información a los tejidos sólidos.

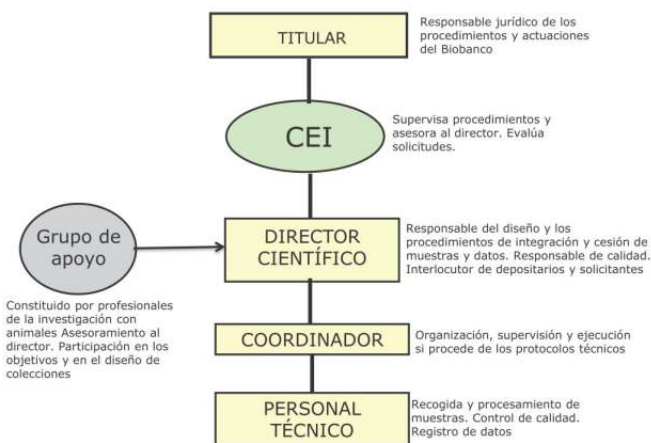


Imagen suministrada por la autoría

Figura 1. Propuesta de modelo de organización interna de un biobanco de tejidos animales.

Además de este esquema básico unitario, pueden contemplarse otros modelos de organización que faciliten la integración sinérgica de recursos entre centros (ver Figura 2):

- **Biobanco en red:** se entiende como tal un biobanco con una única organización administrativa y varios nodos físicos de recogida, procesamiento y almacenamiento de muestras. La gestión científica y técnica está centralizada, los protocolos normalizados que afectan a la recogida de muestras y datos y

el plan de gestión de calidad están unificados pero se realizan en distintos puntos.

- *Redes de biobancos*: en este modelo cada biobanco tiene su plan de gestión y funcionamiento independiente y se establecen acuerdos de colaboración entre varios biobancos, con el fin de promover la armonización para que el intercambio de materiales sea fluido y no se vea afectado por la heterogeneidad de los protocolos.

procesamiento del tejido lo permite, es conveniente proceder en ese mismo espacio a la conservación primaria del tejido (inmersión en fijador o congelación) con el fin de minimizar el tiempo de procesamiento; si no es posible, las muestras se trasladarán en condiciones de seguridad al espacio reservado para ello. Resulta ventajoso que el biobanco cuente además con un laboratorio para la recepción, procesamiento y control de calidad de las muestras, que no debe situarse necesariamente en el animalario.

La ubicación de los locales de almacenamiento de muestras debería estar cercana al servicio de experimentación animal pero fuera de sus zonas de acceso, idealmente en un local anexo bien ventilado. Es importante que el acceso a los contenedores de almacenamiento no esté dificultado por barreras de contención biológica que dificulten la actuación en caso de emergencia, y que la entrada y salida de muestras no requiera protocolos de seguridad biológica. La sala de almacenamiento tiene que estar dotada de un control de acceso con seguridad, razón por la cual se evitará ubicar los congeladores en pasillos y otras zonas de paso. Idealmente, el biobanco contará con tres tipos de contenedores de almacenamiento: armario ignífugo de seguridad para documentos y muestras que se almacenen a temperatura ambiente (bloque de parafina, papel FTA y todos los que se consideren necesarios), congeladores de -80°C, y contenedor de nitrógeno líquido.

Los equipos de frío deben estar dotados de un sistema de seguridad que incluya lo siguiente: un espacio para traslado de muestras en caso de incidencia (equipo de *back-up*), un sistema de alimentación de corriente de emergencia (grupo electrógeno) o en su defecto una bala de CO₂ como medida temporal de mantenimiento del frío, y un sistema centralizado de registro externo de alarmas y temperaturas. El espacio donde se ubiquen estos equipos debe tener una buena ventilación y detectores de oxígeno, sobre todo si no son amplios, para prevenir riesgos laborales por bajada de concentración de oxígeno ante posibles incidentes con nitrógeno.

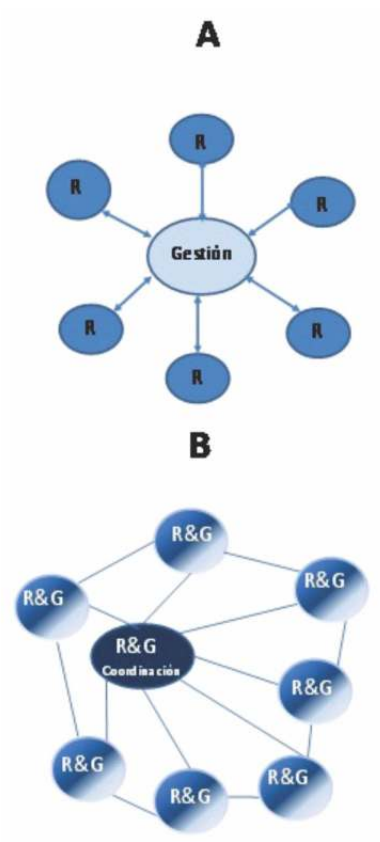


Imagen suministrada por la autoría

Figura 2. Modelos de organización de varios centros de recogida de muestras (R: recogida de muestras y G: gestión de procesos). **A:** Biobanco en red. **B:** Red de biobancos.

GESTIÓN DE MUESTRAS

Instalaciones

La extracción de muestras debe realizarse en las salas de manipulación del servicio de experimentación animal: quirófanos, salas de necropsias, u otras similares. Si el protocolo de

Procedimientos de recogida y conservación

Todos los tejidos deben recogerse de acuerdo con los procedimientos de manipulación aprobados por el Comité de Ética y Bienestar Animal, y utilizando materiales y protocolos que maximicen la esterilidad y preserven la estructura tisular, con el fin de proteger la calidad de las muestras. Es muy importante anotar

la hora de extracción de las muestras. En caso de animales sacrificados habrá que registrar también la hora exacta del sacrificio, así como los datos referentes a la anestesia y método de eutanasia.

Tejidos sólidos

Las muestras se recogerán y procesarán con la máxima celeridad, procurando que el tiempo transcurrido entre la extracción y la congelación no exceda nunca las dos horas. En el caso de no recoger órganos enteros, la zona a seleccionar debe ser la más representativa del tejido u órgano en cuestión, tratando de evitar áreas de necrosis, hemorragia o contaminación, que nos enmascaren las estructuras que pretendemos conservar. Los tres modos de procesamiento más empleados para la conservación de tejidos sólidos son los siguientes:

- *Congelación directa:* se introduce el tejido en el tubo de congelación y se sumerge en nitrógeno líquido. Este procesamiento es muy adecuado para el análisis posterior de ácidos nucleicos y cuantificación de proteínas, pero deteriora la estructura del tejido.
- *Congelación en bloque de OCT (Optimal Cutting Temperature).* Se recomienda realizar una congelación lenta utilizando isopentano enfriado en nitrógeno líquido o nieve carbónica. El isopentano estará suficientemente frío cuando aparezcan formas de perlas y la solución adquiera un aspecto denso. Se dispensa una fina capa de OCT en un criomolde previamente identificado, sobre ella se colocan el órgano si se está procesando entero, o uno o varios fragmentos de tejido con un tamaño mínimo aproximado de 0.3 x 0.3 x 0.3 cm, previamente lavados con solución salina a 4°C. Es importante orientar correctamente el tejido en el criomolde para obtener cortes histológicos óptimos mediante el criostato. A continuación, se cubre el fragmento de tejido depositado con otra capa de OCT, se termina de orientar el tejido con una punta de pipeta y se eliminan las burbujas. Se introduce el criomolde en el isopentano preenfriado con ayuda de las pinzas. Evitar que el isopentano entre en contacto con el OCT, para evitar la formación de burbujas de aire con la consecuente rotura del tejido. Una vez congelado, transferir el criomolde a un congelador de -80°C. Este tipo de procesamiento es apropiado para realizar estudios de expresión y localización de macromoléculas en cortes, para obtener tipos celulares individuales mediante microdissección con láser y para cuantificación de macromoléculas como la congelación normal, previa eliminación del OCT.

- *Fijación seguida de inclusión en parafina.* Los órganos o tejidos pueden fijarse por perfusión y/o por inmersión en el fijador seleccionado. Tanto la elección del fijador como el tiempo de inmersión pueden ser de gran importancia en algunos tejidos y, sobre todo, para el análisis de ciertos componentes. Finalizada la fijación se procede al proceso de deshidratación progresiva del tejido en alcoholes, normalmente etanol, de gradación creciente hasta alcohol de 100°. A continuación se sumerge la pieza en xileno o tolueno no más de 30 minutos para que no se endurezca en exceso el tejido, se incluye en parafina líquida y se deja solidificar. Los bloques de parafina se archivarán debidamente etiquetados y se pueden almacenar a temperatura ambiente. Este tipo de procesamiento es el más adecuado para estudios de estructura tisular, morfología y morfometría, y para estudios inmunohistoquímicos.

Sangre

El tubo de recogida de sangre vendrá determinado por el hemoderivado que interese almacenar: un tubo cualquiera para suero, o con anticoagulante si se desea obtener plasma. Idealmente, además del volumen extraído para procesar y obtener el derivado que interese, se almacenará un volumen mínimo de sangre (1 gota de 100 uL) en papel FTA para futuros usos de genotipado o cualquier otro análisis de DNA. Esta muestra se podrá utilizar para los controles de trazabilidad del Biobanco.

Otras muestras

Para procesar y almacenar otros líquidos biológicos como la orina, líquido cefalorraquídeo o médula ósea se puede optar por la congelación inmediata de los mismos o por incluir una centrifugación suave para depósito de sales y restos celulares antes de su almacenamiento definitivo a -80°C.

Asimismo, es posible que ciertas instituciones puedan valorar el almacenamiento y gestión de otro tipo de derivados biológicos obtenidos por procesamiento de muestras primarias, como por ejemplo líneas celulares seleccionadas por su fenotipo, líneas inmortalizadas o transfectadas con moléculas específicas. Lo importante en estos casos sería, además de garantizar la seguridad biológica en función de los agentes que puedan utilizarse, planificar desde el biobanco el almacenamiento en nitrógeno líquido para mantener la viabilidad de las células.

Trazabilidad y calidad

El aspecto específico y más característico de los biobancos frente a otros modelos de custodia de muestras es la garantía de trazabilidad y calidad que deben ofrecer. Para ello, en el diseño de los procesos se debe tener en cuenta el cumplimiento de los siguientes aspectos:

- *Protocolos operativos* que incluyan etiquetado en todos y cada uno de los pasos, desde el animal vivo hasta la muestras en el congelador, y máxima automatización: códigos de barras, etiquetas 2D, radiofrecuencia, y cualquier otro necesario para cumplir con un protocolo correcto.
- *Procedimientos de control de trazabilidad periódicos*: genotipado aleatorio de muestras, análisis bioquímico de alícuotas hermanas, controles de ubicación.
- *Protocolos de control de calidad de las muestras*: integridad de RNA, análisis anatomopatológico de cortes contrastados con hematoxilina o marcadores inmunohistoquímicos de integridad estructural, que aseguren que conservan las características originales.
- *Protocolos de control de almacenamiento*: registro de la ubicación de un porcentaje de muestras para comprobar que su localización es la esperada.

Además, tal y como se amplía más adelante, es muy conveniente implantar un sistema de gestión de calidad integral de un nivel de desarrollo alto, que incluya sistematizar el registro de indicadores de calidad e incidencias en todos los procesos como parte de su ejecución.

GESTIÓN DE DATOS ASOCIADOS

El verdadero valor de cualquier muestra biológica de calidad está en la información que tiene asociada. Por ello, uno de los aspectos cruciales que debe cuidar un biobanco para garantizar la calidad de las muestras que almacena es la planificación de la recogida, custodia y cesión de datos asociados a las muestras. En un biobanco de tejidos animales deben recogerse como mínimo los datos relacionados con la recogida y procesamiento de la muestra y toda la información que sea posible en relación con el animal de origen. A esto hay que añadir los datos de organización que requiera el biobanco (códigos, firmas, asignación a colecciones, cesiones y cualquier otro que se considere necesario para su correcta identificación). Como norma general, es importante que la información esté recogida en campos de

opciones limitadas de tipo selector múltiple, SI/NO, numérico o similares. Es conveniente evitar en lo posible los campos de texto libre como notas y observaciones que dificultan la estandarización y explotación de la información.

El listado que se muestra a continuación es una propuesta genérica de los datos que deberían acompañar a las muestras integradas en un biobanco de tejidos animales con fines de investigación. Es un punto de partida que cada biobanco debería adaptar a sus capacidades y objetivos.

Datos del centro
Centro de origen (selector)
Lugar de recogida de la muestra (selector con los puntos de recogida)
Responsable: nombre del investigador responsable del animal (selector)
Colección (selector)

Datos asociados al animal
Especie (selector)
Cepa (selector)
Tipo de transgénesis, de existir (selector)
Edad (numérico)
Sexo (M-F)
Tipo de dieta
Ayuno/Alimentación
Estado sanitario
Patología en estudio (selector)
Intervención quirúrgica:
Nombre (texto o selector)
Fecha (fecha)
Responsable: nombre del operario (selector)
Anestesia (texto o selector)
Intervención biológica:
Agente biológico (texto o selector)
Vía de administración (selector)
Posología (texto)
Fecha inicio y fin (fecha)
Intervención farmacológica:
Fármaco, dosis, (texto)
Vía de administración (selector)
Posología (texto)
Fecha inicio y fin (fecha)
Signos clínicos al sacrificio (Texto o selectores)
Método de diagnóstico (texto)
Método de eutanasia (texto o selector)
Anestesia (texto o selector)
Notas (texto)

Datos asociados a las muestras
Origen del tejido (selector)
Clase de tejido: sano, patológico, tumor, no tumor (selector)
Modo de recogida: tubo con EDTA, heparina, frasco estéril, suero fisiológico (selector)
Fecha y hora de obtención (fecha y hora)
Responsable del procesamiento: nombre del operario (selector)
Tipo de procesamiento: fijación-inclusión, congelación inmediata, congelación con OCT, plasma, suero, centrifugación y todos los que proceda (selector)
Fijador (selector)
Tiempo de fijación (número)
Fecha y hora de congelación/fijación (fecha y hora)
Tiempo entre la extracción y la conservación (numérico, calculado)
Datos asociados bioquímicos (SI/NO)*
Datos Anatomía Patológica (SI/NO)*
Datos clínicos del animal (SI/NO)
Número de alícuotas (numérico)
Soporte de almacenamiento: criomolde, criotubo, cassette o cualquier otro que garantice su almacenamiento (selector)
Etiquetas de las alícuotas (alfanumérico)
Localización (selectores)
Notas (texto)
*Cada centro deberá diseñar el modo de gestión de estos datos. Idealmente habría que integrarlos en la base de datos a través de formularios específicos de colección

Datos del uso de las muestras
Solicitud (numérico)
Documento de solicitud (enlace o PDF)
Investigador (selector)
Centro (selector)
Fecha de recepción (fecha)
Fecha de aprobación por el CEI (fecha)
Fecha de envío (fecha)
Número de individuos solicitados (número)
Origen de tejido: sangre, riñón, orina, músculo, o el que proceda (selector)
Clase de tejido: patológico, sano, tumor, no tumor (selector)
Conservación: fijado, congelado (selector)
Número de cortes/piezas por individuo (número)
Volumen de muestra por individuo (número)
Notas (texto)

ORGANIZACIÓN FUNCIONAL

Integración de muestras y colecciones

Cada biobanco debe establecer, a través de su Comité de Ética y de su grupo de apoyo, cuáles son los objetivos científicos y

cuáles son las prioridades específicas de integración de muestras, en términos de especies y cepas indispensables, tipos de tejidos de especial interés, y derivados o procesamientos más demandados. Para ello, es importante tener en cuenta las necesidades presentes y prever las necesidades futuras tanto para sus usuarios internos como para la comunidad científica en su conjunto. Estas prioridades deberían revisarse periódicamente y adaptarse a los recursos del servicio para elaborar un plan de integración de colecciones realista y asumible.

El procedimiento de integración de muestras debe quedar documentado a través de la firma de un *registro de depósito* entre el investigador originariamente responsable de los animales y el titular del Biobanco, o quien lo represente. Este documento recogerá las características de la colección, las condiciones técnicas de recogida y procesamiento, y los posibles escenarios de cesión a terceros que deban aplicarse. Cuando el investigador pertenezca a una institución distinta a la del biobanco, el documento de registro podrá incluir un *acuerdo de transferencia de materiales* entre instituciones.

Solicitudes y cesiones

La filosofía general de cualquier biobanco debe estar basada en el uso universal de las muestras y, por lo tanto, cualquier investigador puede solicitar materiales biológicos y datos asociados a cualquier biobanco. El proceso de solicitud debe estar documentado del modo más sencillo posible a través de un *formulario de solicitud*, y cada solicitud podrá ser evaluada por el CEI del propio biobanco, o lo será necesariamente si no estuviese ya evaluada por otro comité. El biobanco hará un *informe de disponibilidad* para el solicitante y, si ambas partes están de acuerdo, se procederá a la firma de un *acuerdo de cesión* que debe recoger la descripción de los materiales transferidos, el uso previsto para los mismos y los compromisos que adquieren ambas partes. El biobanco deberá advertir del posible carácter infeccioso de las muestras y de la calidad de las mismas en la medida de lo posible. Asimismo, podrá exigir al solicitante la no cesión de esos materiales a otros grupos, el uso exclusivo para los fines informados y el reconocimiento del origen de las muestras (biobanco y depositario, si procede) en futuras comunicaciones científicas. Podrá establecerse dentro de este acuerdo una colaboración científica entre el responsable original de las muestras y el solicitante, si ambas partes lo consideran oportuno. El biobanco podrá repercutir al solicitante todos los gastos originados por la recogida, el procesamiento y el almacenamiento de las muestras y datos.

MODELO DE GESTIÓN INFORMÁTICA

Los sistemas de gestión de la información, entendiéndose como tal al conjunto de datos organizados en poder de una entidad que posean valor para la misma, son un activo fundamental para el buen funcionamiento de cualquier organización. Desde este punto de vista, la seguridad de la información viene definida por tres dimensiones básicas:

- *Confidencialidad:* la información sólo puede ser accesible a individuos, organizaciones o procesos autorizados.
- *Integridad:* la información debe ser exacta y completa, no puede ser alterada.
- *Disponibilidad:* la información debe ser accesible a las personas o procesos autorizados cuando lo requieran.

El diseño de gestión de la información del biobanco debe realizarse de acuerdo con el Sistema de Gestión de Seguridad de la Información que esté implantado en el centro que lo acoge.

Las bases de datos convencionales que existen en el mercado (Access, File Maker, u otras similares) son herramientas muy útiles para la gestión de la información que puede implicar un biobanco de tejidos animales. Sin embargo, presentan limitaciones tales como la escasa escalabilidad, la imposición de acceso local, a través de habilitación de accesos remotos o a través del uso de soportes auxiliares que comprometen la seguridad, la explotación de datos limitada y la necesidad de conocimientos de configuración para su mantenimiento. Todo ello supone en su conjunto una limitación en la gestión que puede ser irrelevante o trascendente en función del tamaño y la actividad del biobanco.

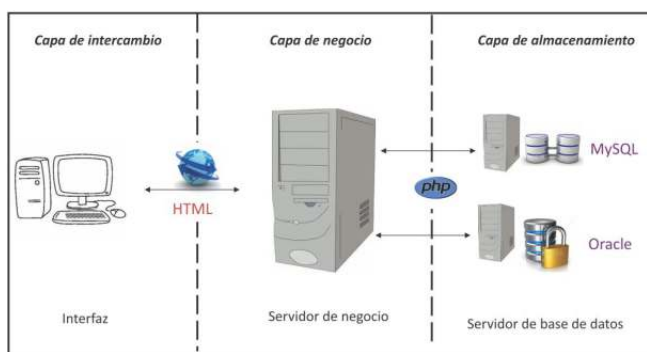


Imagen suministrada por la autoría

Figura 3. Representación esquemática de un diseño de arquitectura web para la gestión de datos y procesos.

Para optimizar la gestión de datos y procesos en un biobanco sin límites de acceso ni de volumen de datos, lo más recomendable es el uso de una aplicación de arquitectura web con un esquema cliente-servidor clásico estructurado en tres capas: a) la interfaz gráfica de presentación al usuario, b) la capa de negocio que aloja los programas de ejecución y comunicación, y c) la capa de almacenamiento constituida por una o varias bases de datos relacional tipo Oracle o SQL (ver Figura 3).

Este tipo de plataformas permiten aplicar en el diseño recursos de seguridad integrados que incluyen procedimientos de seguridad SQL para el acceso a la base de datos y protocolos criptográficos del tipo SSL para encriptar toda la comunicación telemática. El usuario accede a través de cualquier navegador utilizando usuario y contraseña, y pueden establecerse niveles de acceso a módulos autorizados. Se registran entradas, salidas, accesos fallidos y todas las modificaciones que realizan los usuarios autorizados, y se conservan los valores que han sido modificados (base de datos auditable). Además, con este modelo de herramienta, el flujo de trabajo está dirigido por la propia aplicación informática, lo que implica que se puede predeterminedir el orden de las actividades y la información que el sistema requiere para el registro de las muestras y la ejecución de los procedimientos. Por ejemplo, se puede definir como campo requerido la hora de sacrificio del animal, el operario responsable de la extracción, el tipo de tubo de obtención, la hora de congelación y todos aquellos datos que se consideren necesarios para garantizar la perfecta conservación de la muestra. De esta forma el biobanco puede configurar el registro de un conjunto mínimo de datos que aportarán calidad a las colecciones. Asimismo, estos sistemas de gestión pueden incluir almacenamiento de documentos e imágenes que pueden ser de gran utilidad para el biobanco. En síntesis, el diseño de plataforma web garantiza la trazabilidad de las muestras y de todos sus datos asociados, y facilita la calidad de los procedimientos del biobanco.

SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD

Implantar un sistema de gestión de calidad es un requisito básico para el funcionamiento de cualquier organización que necesite garantizar la calidad de sus productos y procedimientos. En el caso de un biobanco, la calidad es un objetivo prioritario por lo que es recomendable diseñar su estructura y planificar la actividad sobre un sistema de gestión por procesos, que permita controlar la calidad y favorecer la mejora continua del servicio. El enfoque basado en procesos supone gestionar todas las actividades que se desarrollan en el biobanco y todos los recursos

necesarios para llevarlas a cabo como procesos que interaccionan entre sí, de tal forma que se puede entender la organización como un conjunto. La ventaja principal de este enfoque es que permite hacer que prospere cada uno de los procesos de manera independiente, lo que se traduce en una mejora de todo el conjunto de la organización, consiguiendo así mejorar el producto o servicio al que está dedicada la organización. En el caso de los biobancos, el modelo básico de mapa de procesos debería incluir la obtención, procesamiento, almacenamiento y cesión de muestras como procesos operativos, y los procesos de apoyo y estratégicos que cada organización utilice o considere oportunos. En la Figura 4 se muestra un modelo simple de mapa de procesos de un Biobanco.

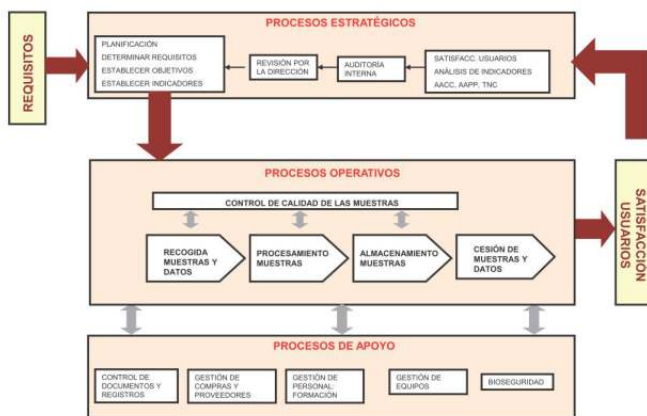


Imagen suministrada por la autoría

Figura 4.- Esquema genérico de un mapa de procesos representativo de un banco de tejidos animales.

Un sistema de gestión de calidad se fundamenta en un esquema de trabajo cíclico que contempla la autoevaluación periódica para trabajar sobre un diseño de mejora continua. El punto de partida es identificar los requisitos que son de aplicación y buscar las estrategias para conseguir la satisfacción de todos ellos. Los requisitos comprenden aquellos establecidos por los usuarios del biobanco (tanto de los colaboradores que ceden las muestras como de los investigadores que las solicitan), los requisitos legales o reglamentarios, y cualquier otro requisito que el propio biobanco establezca para mejorar el desempeño de su actividad. A partir de ellos se diseñan las actividades para la implantación de este sistema cíclico, que comprende los siguientes pasos:

- **Planificar:** definir las estrategias, establecer los objetivos e

indicadores, diseñar y definir los procesos y procedimientos.

- **Hacer:** puesta en práctica de los procedimientos y registro de la actividad.
- **Verificar:** comprende el seguimiento y evaluación de la actividad mediante el análisis de indicadores, la auditoría interna y la revisión por la dirección.
- **Actuar:** engloba las decisiones que emergen del análisis por la dirección y las acciones correctivas y preventivas, aunque estas últimas no son específicas de esta etapa. Conlleva una nueva planificación, cerrando así el ciclo de mejora continua.

Para que el sistema de gestión de calidad funcione de manera eficaz es imprescindible la implicación total de la dirección y la de todo el personal del biobanco. La dirección, además de implicar a todo el personal y comunicar la importancia de satisfacer los requisitos establecidos, tiene que facilitar los recursos necesarios (materiales y humanos), liderar la planificación estableciendo una política de calidad y unos objetivos medibles y coherentes, y revisar periódicamente el sistema promoviendo las acciones que sean oportunas para la mejora continua del servicio. La implicación de todo el personal conduce a una mayor motivación respecto a las metas que establece la dirección y, por tanto, a un mayor aprovechamiento de las habilidades personales y una mayor responsabilidad en el desempeño de las actividades. Es imprescindible que todo el personal conozca y participe activamente en el sistema de gestión de calidad poniendo especial interés en mantener los registros completos y actualizados cuando estén desarrollando sus actividades, ya que éstos son la base para el análisis, revisión y mejora continua del sistema de gestión de calidad.

CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta todos los aspectos positivos recogidos en el presente documento, invitamos a todos los Centros e Instituciones que tengan posibilidades en cuanto a infraestructuras y flujo de material para la investigación a iniciar las tareas para crear su propio biobanco y asociarse con otros en un modelo colaborativo tipo red, con el objetivo de colaborar tanto a nivel interno (diferentes grupos de trabajo) como a nivel externo (entre diferentes centros).

La importancia que puede suponer el desarrollo de estas Unidades para los propios Centros o Instituciones queda avalada, según reflejamos en diversos apartados de este documento, en términos de mejora organizativa para optimizar el

aprovechamiento de materiales y procedimientos. De igual importancia es la creación de la infraestructura adecuada en cuanto a registro y comunicación de muestras y datos, para facilitar el intercambio de materiales e impulsar una mayor cooperación en investigación con animales.

Recordamos que el almacenamiento de muestras biológicas es una práctica de alto valor estratégico para la investigación; la gestión de muestras de animales supone conseguir uno de los objetivos contenidos en el principio de las 3 Rs y además, hoy en día es un deber legal (RD53/2013).

BIBLIOGRAFÍA

- RD 176/2011 de 18 de noviembre por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos. BOE 290, 2 diciembre de 2011.
- www.redbiobancos.es Instituto de Salud Carlos III.
- Respuestas a las preguntas más comunes sobre el Real Decreto 1716/2011 sobre biobancos. <http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-el-instituto/fd-organizacion/fd-estructura-directiva/fd-subdireccion-general-investigacion-terapia-celular-medicina-regenerativa/fd-centros-unidades/Preguntas-y-respuestas-RD-1716-2011.pdf>
Transporte de muestras para biobancos. Red de Biobancos. ISCIII. http://www.redbiobancos.es/pages/docs/Documento_Transporte_de_muestras.pdf
- Documentos técnicos de procesos. Red de Biobancos. ISCIII
- www.biobancovasco.org
- www.biobancochuvi.info
- Decreto 81/1997 de 13 de marzo por el que se regulan los Bancos de Tejidos en la Comunidad Autónoma de Andalucía. BOJA 44, 15 de abril de 1997.
- UNE-EN ISO 9000:2005: Sistemas de gestión de la calidad. Fundamento y vocabulario.
- UNE-EN ISO 9001:2008: Sistemas de gestión de la calidad. Requisitos.
- Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humano, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica. BOE núm 290, pp 128434-128454, de 2 de diciembre de 2011.
- *Guía para la implantación del sistema de gestión de calidad del biobanco*. Red Nacional de Biobancos, Mayo 2012.
- http://redbiobancos.es/Pages%5CDocs%5CDocumento_Sistema_de_Calidad_para_Biobancos.pdf
- *Guía práctica para la utilización de muestras biológicas en investigación biomédica*. Instituto Roche. www.instituto Roche.es/web/pdf/guia/pdf_completo.pdf
- Organisation for Economic Co-operation and Development. OECD Best Practice Guidelines for Biological Resource Centres. 2007. <http://www.oecd.org/sti/biotech/38777417.pdf>
- Vaught J., Campbell L.D., Betsou F., et al. *The ISBER Best Practices: Insight from the Editors of the Third Edition*. Biopreservation and Biobanking 2012,10(2):76.
- Campbell L.D., Betsou F., Garcia D.L., et al. *Development of the ISBER Best Practices for Repositories: Collection, Storage, Retrieval and Distribution of Biological Materials for Research*. Biopreservation and Biobanking 2012,10(2):232.
- Betsou F., Luzergues A., Carter A., et al. *Towards norms for accreditation of biobanks for human health and medical research: compilation of existing guidelines into an ISO certification/accreditation norm-compatible format*. The Journal of Quality Assurance 2008,11(2):221-94.

Técnica Microquirúrgica: Implantación de un catéter en vena femoral en roedores

A. de Francisco¹, **Y. Sierra-Palomares**³, **Angélica Horrillo Ledesma**¹, **Fernando Asensio**², **M. Desco**^{1, 2, 3, 4}

¹ Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón

² Unidad de Medicina y Cirugía Experimental (UMCE), Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM)

³ Centro de Investigación Biomédica En Red de Salud Mental (CIBERSAM)

⁴ Departamento de Bioingeniería e Ingeniería Aeroespacial, Universidad Carlos III de Madrid

INTRODUCCIÓN

La colocación de un catéter central permanente en el animal es útil en estudios en los que hay que administrar sustancias intravenosas de forma continua o frecuente, también para medir la presión arterial o para obtener muestras de sangre seriadas en estudios longitudinales.

Se puede cateterizar la vena, la arteria o ambas, según la necesidad del estudio, tanto en rata como en ratón y sin que la extremidad pierda funcionalidad, debido a que ésta sigue recibiendo aporte sanguíneo gracias a la circulación colateral vicariante.

La mayor dificultad en la colocación del catéter vendrá determinada por el calibre y elasticidad del vaso (siendo más complicado cateterizar la arteria que la vena, y en el ratón más que en la rata).

MATERIALES (ver Figura 1)

- **Instrumental quirúrgico:** porta agujas Castroviejo recto, pinzas (mosquito tipo Hartman recta, rectas serradas, rectas con dientes, de microcirugía rectas), bisturí y tijeras de cirugía rectas.
- **Medicamentos:** isofluorano (3% inducción y 1.5% mantenimiento en 100% O₂), ketamina (50-100 mg/kg), xilacina (1-5 mg/kg), heparina (1000 UI/ml) y lubricante oftalmológico.
- **Otros:** tubo de poliestireno (rata: D.I. 0.58 mm y D.E. 0.965 mm), hilo de nylon (D.E. 0.96 mm), sutura de 3-0 no reabsorbibles, ligadura de 3-0, gasas, bastoncillos, esparadrapo, crema depilatoria, jeringa con aguja, solución limpiadora, lubricante oftalmológico, mesa quirúrgica, lupa,



Imagen suministrada por la autoría

Figura 1.- Instrumental necesario para la implantación de un catéter en vena femoral en roedores.

luz blanca fría, luz infrarroja o manta térmica, termómetro, vaso de precipitados, pipeta de 10 ml y lupa 40X.

PROCEDIMIENTO

Preparación del catéter

1. Preparar 20 cm aprox. de tubo de polietileno (ver Figura 2). En un extremo se realiza un pequeño bisel para facilitar la entrada en la vena o arteria.
2. Purgar el catéter con heparina y suero (1:10) asegurándonos de que no quede aire en su interior.
3. Cerrar el otro extremo con un tapón de hilo de nylon.

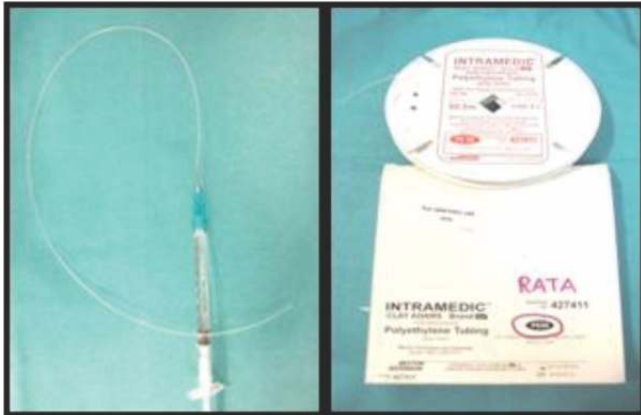


Figura 2.- Preparación del catéter.

Imagen suministrada por la autoría

Preparación del animal

1. Anestesiarse al animal.
2. Premedicar con analgésico y antibiótico según la prescripción del veterinario.
3. Controlar la temperatura del animal mediante un sistema de regulación homeotérmico acoplado a una fuente de calor proveniente de una manta térmica o lámpara infrarroja, aplicar lubricante oftálmico para evitar que se reseque la córnea durante el procedimiento.

Técnica

1. Colocar al animal en decúbito supino sobre la tabla quirúrgica, inmovilizado por las extremidades.

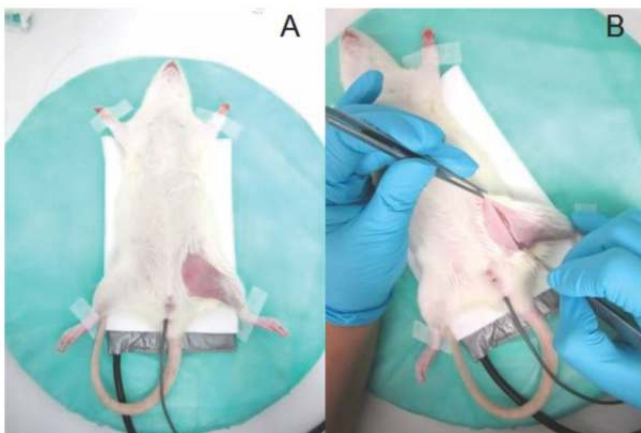


Figura 3.- Preparación del animal y zona de abordaje.

Imagen suministrada por la autoría

2. Depilar la zona de incisión (ingle y en caso de colocación permanente del catéter, la parte posterior del cuello del animal), limpiar y desinfectar (ver Figura 3A).
3. La zona de abordaje será en el pliegue inguinal del animal y en dirección oblicua, aproximadamente de 3 cm (ver Figura 3B).
4. Realizar una incisión en el tejido (ver Figura 4A) y disecar con tijeras y bastoncillos de algodón (ver Figura 4B). Buscar la zona de la femoral más interna, cercana al músculo abdominal, y aumentar el campo de visión mediante un punto de tracción al músculo y retraer la ligadura (ver Figuras 4C y 4D).

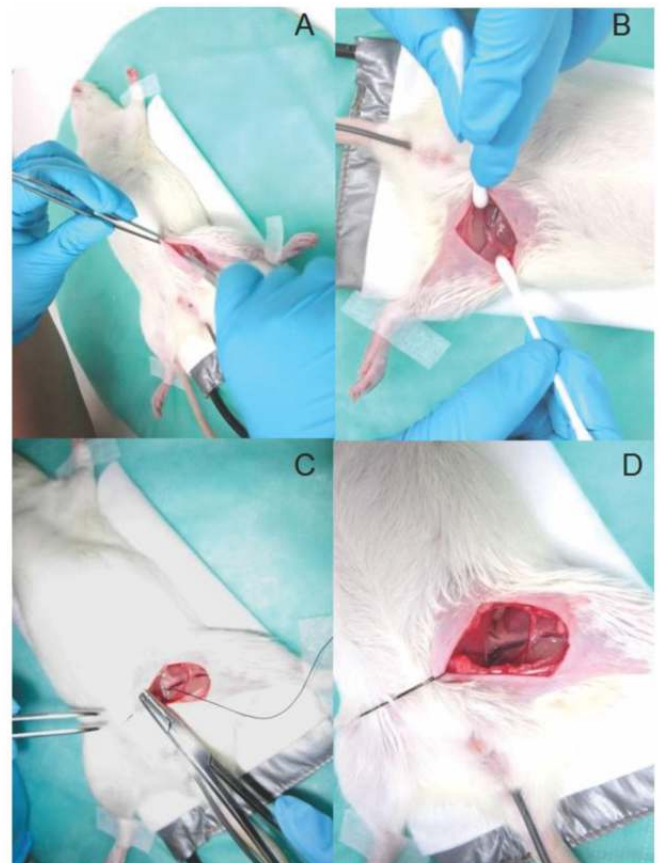


Imagen suministrada por la autoría

Figura 4.- Abordaje de la femoral.

5. Disecar la vena, la arteria y el nervio femoral (ver figura 5A). Pasar dos ligaduras por debajo de la vena (una distal y otra proximal) a ambos lados de la bifurcación del vaso (ver Figura 5B).

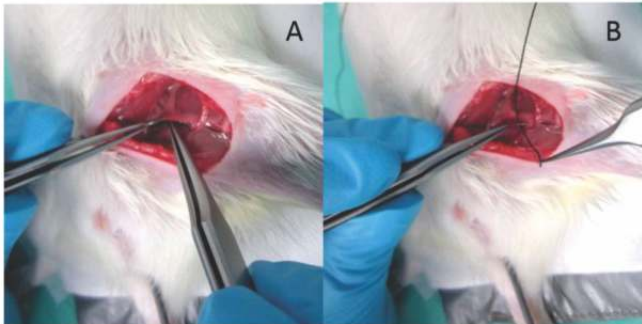


Imagen suministrada por la autoría

Figura 5.- Aislamiento de la vena femoral.

6. Cortar el flujo sanguíneo, en la zona más distal, anudando con la ligadura. Cerrar temporalmente el flujo en el extremo proximal, sin anudar la ligadura, sujetándola con un mosquito. Se puede usar un pedazo de globo bajo el vaso a cateterizar para dar contraste al campo y facilitar la visión (ver Figura 6).

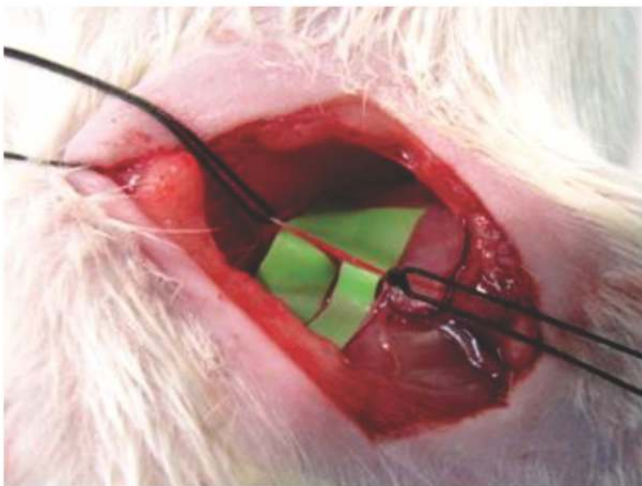


Imagen suministrada por la autoría

Figura 6.- Corte del flujo sanguíneo.

7. Realizar un pequeño corte en el vaso, sin llegar a seccionarlo. La abertura no debe quedar muy cerca de la sutura proximal para que quede espacio suficiente para empujar el catéter (ver Figura 7).
8. Sujetar el vaso e introducir el bisel del catéter (ver Figura 8A), aflojar la ligadura proximal e introducir poco a poco el catéter (1 cm aprox.), con cuidado de no perforar el vaso. Anudar la ligadura proximal alrededor del catéter (ver Figura 8B).

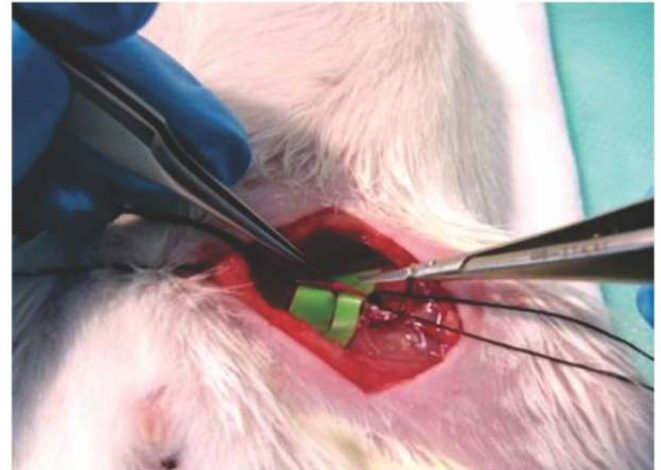


Imagen suministrada por la autoría

Figura 7.- Abertura de la vena femoral.

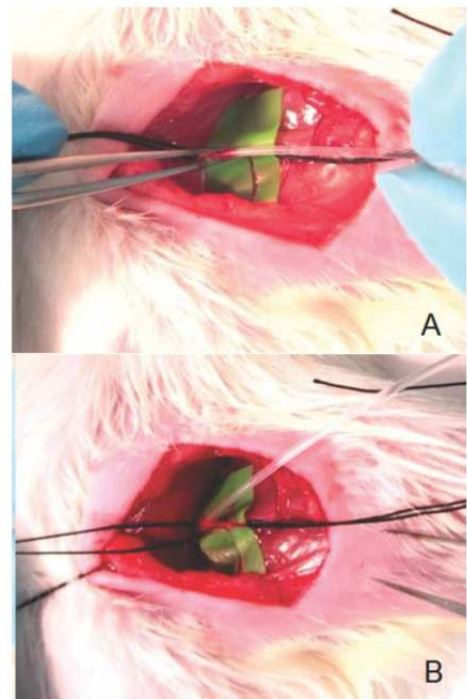


Imagen suministrada por la autoría

Figura 8.- Introducción y fijación del catéter.

9. Comprobar que la sangre fluye a través del catéter y lavar con suero y heparina (0.1 ml de heparina en 1 ml de suero fisiológico) para evitar que se obstruya (ver Figura 9A). Anudar los cuatro cabos de ligadura "en cruz" para fijar el catéter -los 2 distales y los 2 proximales- (ver Figura 9B) y cortar el resto de ligadura (ver Figura 9C).

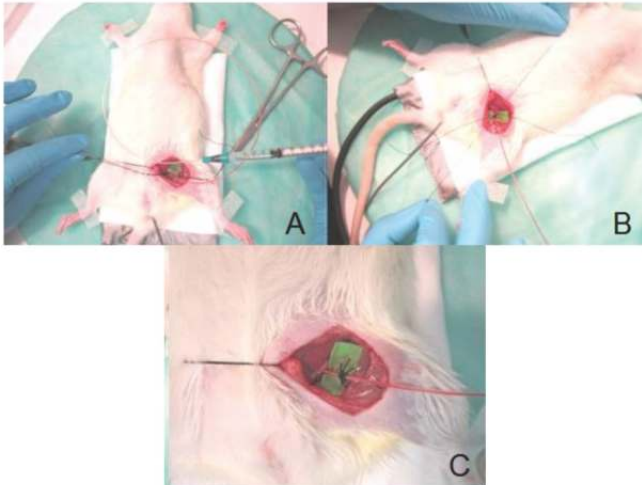


Imagen suministrada por la autoría

Figura 9.- Comprobación y fijación del catéter.

10. Tunelizar el catéter a través del espacio subcutáneo a lo largo de la región dorsal del animal (ver Figura 10A), ya que si quedase expuesto en la zona ventral del animal, podría morderlo y arrancarlo. Para externalizarlo, realizar una pequeña incisión en la parte superior a nivel cervical y pasar el catéter por el dorso hasta sacarlo por la incisión (ver Figuras 10B y 10C).

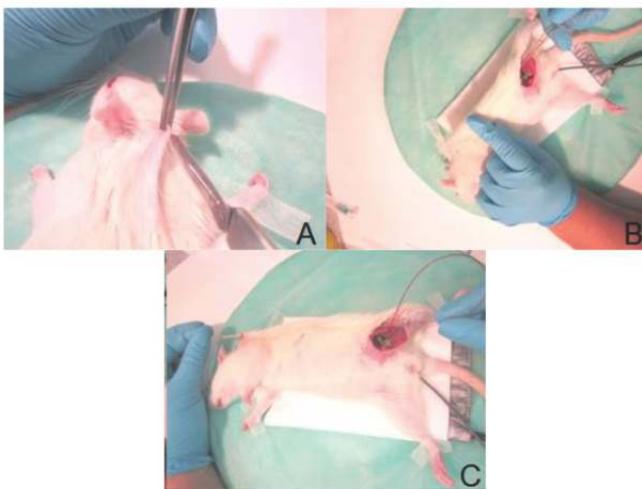


Imagen suministrada por la autoría

Figura 10.- Tunelización del catéter.

11. Colocar el catéter, haciendo un bucle para evitar que se acode y suturar la incisión inguinal (ver Figuras 11A y 11B), con

cuidado de no perforar el catéter. Limpiar y desinfectar la zona con antiséptico (ver Figura 11C).

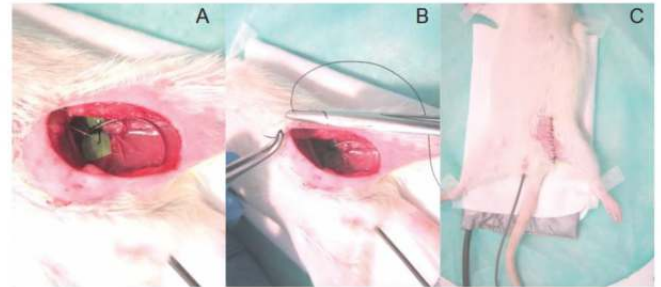


Imagen suministrada por la autoría

Figura 11.- Colocación del catéter y limpieza y desinfección de la zona.

12. Comprobar la permeabilidad del catéter, lavar con suero y heparina. Ajustar la longitud del catéter, cortando lo que sobre. Colocar un tapón de hilo de nylon que ajuste bien. Suturar la incisión dorsal y desinfectar la zona con antiséptico.

Cuidados post-operatorios

Colocar al animal en su cubeta para su recuperación tras la anestesia y aplicar calor (con lámpara infrarroja), **a una distancia que no pueda dañar al animal**. Cuando despierte, retirar la lámpara e incorporar la comida y el agua a la cubeta. Como medida analgésica, inyectar un **AINEs (antiinflamatorio no esteroide) al animal durante los tres días posteriores a la cirugía**. Diariamente lavar el catéter con suero + heparina + antibiótico (según la recomendación del veterinario) para evitar que se obstruya (vida útil del catéter 1-2 meses).

CONCLUSIONES

Gracias al dominio de esta técnica se ha conseguido administrar sustancias a los animales diariamente (por vía intravenosa) durante períodos superiores a 30 días y sin que perdieran la funcionalidad de la extremidad, en estudios en los que la supervivencia del animal debía alcanzar los 6 meses.

Además, el realizar esta técnica en la arteria femoral nos permite monitorizar la presión arterial.

Aspectos a tener en cuenta en la implantación de un Servicio de Cirugía Experimental

Luis Dávila Gómez¹, María Reyes Panadero² y Francisco Miguel Sánchez-Margallo³

¹Veterinario Jefe del Servicio de Animalario del Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón

²Veterinaria Jefe del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Extremadura

³Director Científico del Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón

INTRODUCCIÓN

Cada vez más se demanda por los usuarios de nuestros centros el empleo de técnicas quirúrgicas en animales de experimentación dentro del desarrollo de un proyecto de investigación o como parte de un programa formativo quirúrgico que se desarrolle en modelos animales. La situación ideal es que se definieran a la perfección los usos de los diferentes espacios dentro de nuestras instalaciones para llevar a cabo un diseño adecuado y racional del proyecto constructivo con anterioridad. La mayor parte de las veces, estas necesidades puede que no se plantearan antes de la construcción del centro o hayan surgido con posterioridad para adaptarse a una nueva demanda de los investigadores. Como quiera que fuese, deberemos hacer un diseño lo más adecuado a nuestras necesidades próximas y futuras.

GENERALIDADES

Una de nuestras premisas fundamentales en el diseño de un Servicio de Cirugía Experimental, es que no deben existir diferencias significativas entre nuestro futuro quirófano experimental y un quirófano convencional de humana, en cuanto a las exigencias en las condiciones de asepsia y esterilidad para poder cumplir con el Refinamiento en el empleo de animales de experimentación. Otro aspecto fundamental a tener en cuenta es la/s especie/es animal/es con las que trabajaremos. Nuestras instalaciones y equipamiento deben permitir que el desarrollo del trabajo en el quirófano experimental sea seguro y cómodo para nuestros usuarios y, por tanto, se deben adaptar a las especies con las que trabajemos y a sus características especiales, y no al contrario.

Por otra parte, y ya que las necesidades experimentales son

cambiantes, nuestro Servicio de Cirugía Experimental debe permitir un uso polivalente en cuanto a los espacios y los equipos para ofrecer un mejor servicio a nuestros investigadores.

Todos los usuarios y posibles usuarios deben ser consultados para hacer una planificación correcta de las instalaciones que serán utilizadas en el futuro Servicio de Cirugía Experimental (ver Figura 1).



Imagen suministrada por la autoría

Figura 1.- Vista panorámica de un quirófano experimental integrado y equipado.

CONSIDERACIONES CONSTRUCTIVAS Y TÉCNICAS

Ubicación

La zona quirúrgica debe encontrarse alejada de zonas de paso de material, personal y animales, además de posibles zonas de contaminación como pueden ser almacenes de reactivos, salas de necropsias y perfusión, y otras fuentes de contaminación.

Superficies

Hay que prestar especial atención a los materiales empleados para recubrir todas las superficies: paredes, suelos y techos.

Deben ser lo más lisos posibles, impermeables, sin rugosidades, continuos, sin uniones o si las presentan que no tengan recovecos. Además, deben ser fácilmente limpiables y desinfectables por lo que los materiales deben ser resistentes a los detergentes y desinfectantes a emplear. En las uniones entre paredes y techo y en los rincones, se procurarán uniones redondeadas que impidan el acúmulo de suciedad y favorezcan las labores de limpieza (ver Figura 2). Los suelos deben ser de material duradero que soporte las frecuentes limpiezas y desinfecciones, pasos de material y personal y además que cumpla con la normativa en cuanto a la conductividad. Los techos deben seguir las mismas reglas que las demás superficies y no se debería tener acceso al espacio que hay por encima de ellos para evitar contaminaciones.



Imagen suministrada por la autoría

Figura 2.- Detalle de un perfil sanitario en unión entre las paredes y el suelo.

Ventilación

Uno de los principales puntos críticos es la ventilación. El diseño de un sistema de ventilación adecuado es fundamental para la zona quirúrgica ya que debemos proporcionar un ambiente controlado y agradable para animales y personal, aportar un aire de buena calidad desde el punto de vista microbiológico, asegurar unos flujos de aire correctos que minimicen los riesgos y eliminar los posibles gases nocivos que en la actividad quirúrgica se generan. Habrá que prestar especial atención a la temperatura, humedad relativa, número de partículas, renovaciones, velocidad del aire, aporte de aire exterior y recirculación, presión y ruido.

Podemos diseñar nuestro sistema de ventilación siguiendo las normas y recomendaciones existentes en cuanto al diseño,

instalación, funcionamiento, mantenimiento y validación de los sistemas de ventilación en hospitales (UNE 100713:2005; UNE-EN ISO 14644:2005). En estas normas se clasifican los espacios sanitarios en función del nivel de exigencia higiénica en cuanto al uso que se hará de ellos y, además, en cuanto al nivel de riesgo para el paciente.

En la primera clasificación, los espacios se dividen en locales de Clase I, con exigencias higiénicas muy elevadas (como pueden ser los quirófanos y zonas de almacén de material estéril, por ejemplo), y locales de Clase II, con exigencias habituales (zona de preparación de animales). En los locales de Clase I se exigen tres niveles de filtración y dos en los de Clase II. Los niveles de filtración se dispondrían en un primer nivel a la entrada de aire exterior, en un segundo nivel después de la unidad de tratamiento de aire y al comienzo de las conducciones y un tercer nivel lo más cerca posible de las salas del mismo tipo a ventilar, como podría ser en la unidad de impulsión.

En una segunda clasificación y en función del nivel de riesgo, los quirófanos se dividen en tres categorías: de Tipo A (quirófanos de cirugía especial o de alta tecnología), de Tipo B (quirófanos convencionales) y C (quirófanos de cirugía ambulatoria).

Cuanto mayor sea el nivel de exigencia de la zona quirúrgica mayor será el nivel de inversión necesaria para su puesta en marcha, verificación y mantenimiento posterior.

La temperatura y la humedad relativa deberían estar entre los 22-26°C y el 50-70% HR, para asegurar una zona térmica y de humedad relativa de confort para los animales y usuarios. Al disminuir el número de partículas circulantes disminuimos la probabilidad de que virus, hongos y bacterias causen infecciones en nuestros animales. Las estrategias para eliminar estas partículas son mediante movimientos de aire por desplazamiento (flujo laminar) y por dilución (flujo de aire turbulento). El flujo laminar es el tratamiento de elección en quirófanos con alto grado de exigencia aséptica e implica velocidades de aire mayores. Si optamos por un flujo de aire turbulento, el factor clave es el lugar en el que se colocan las rejillas de extracción para asegurar una renovación eficiente y la eliminación de gases tóxicos, como pueden ser los anestésicos y el CO₂. En cuanto a las presiones, debemos mantener un diferencial de presiones entre las zonas de mayor exigencia higiénica y las de menor para evitar contaminaciones. Las puertas deberán ser estancas para conseguir estas sobrepresiones. La tasa de recirculación es otro de los aspectos a tener en cuenta a la hora de diseñar el sistema de

ventilación, ya que debemos recircular aire sólo de las mismas zonas a tratar y no hacer recirculaciones excesivas para poder eliminar gases tóxicos que se produzcan durante los procedimientos quirúrgicos.

Iluminación

Debemos colocar luminarias que aseguren una perfecta iluminación cumpliendo con la normativa en cuanto a seguridad y eficiencia energética. Esta iluminación debe estar perfectamente distribuida por todo el quirófano y debe ser regulable en intensidad y por zonas. Es fundamental que la iluminación esté asegurada aunque se produzcan cortes en el suministro eléctrico.

Instalación de gases medicinales, sistema de vacío y extracción de gases anestésicos

La instalación de un sistema centralizado y canalizado de gases, así como un sistema de vacío, es la solución más idónea para nuestra zona quirúrgica experimental. Esta instalación debe adaptarse a nuestras necesidades, por lo que debemos añadir los gases que sean utilizados en nuestros procedimientos, como por ejemplo, toma de gas CO_2 en caso de que hagamos cirugía laparoscópica. Deberán estar disponibles las conexiones de gases en el quirófano, salas de preparación y zona de recuperación. Una lista posible sería: O_2 , aire medicinal, vacío, aire comprimido, extracción de gases anestésicos y CO_2 (ver Figuras 3 y 4). En caso de que ocurra un fallo en el sistema centralizado de gases, podemos disponer de algunos tanques adicionales y/o generadores de oxígeno, por ejemplo. Cuando empleamos gases medicinales debemos contar con sistemas de detección y alarma para detectar niveles anormales de estos gases en el ambiente de la zona quirúrgica experimental y que puedan suponer un riesgo para los usuarios.

Instalación eléctrica

El suministro eléctrico debe estar en todo momento asegurado al tratarse de una zona especialmente sensible. Para ello debemos contar con un Sistema de Alimentación Ininterrumpida (SAI) mediante acumuladores y/o generadores eléctricos. Deben instalarse tomas de enchufe a SAI para los equipos esenciales, aunque muchos de ellos ya disponen de sus propias baterías para no interrumpir su funcionamiento. Por supuesto, toda la instalación eléctrica debe cumplir el Reglamento Electrotécnico de Baja Tensión (REBT) para la protección de los equipos, personal y animales de la zona. Es fundamental el seguir un programa de mantenimiento exhaustivo.



Imagen suministrada por la autoría

Figura 3.- Brazo telescópico móvil con conexiones de gases medicinales, vacío y extracción de gases anestésicos.



Imagen suministrada por la autoría

Figura 4.- Detalle de las conexiones del brazo telescópico móvil.

Comunicaciones

Debemos instalar intercomunicadores, teléfonos y cualquier otro medio que permita la comunicación entre zonas del interior y el exterior. Además, podemos instalar sistemas de red para exportar e importar datos desde o hasta la zona quirúrgica experimental.

PROPUESTA DE DISEÑO Y FLUJOS DE PERSONAL, ANIMALES Y MATERIALES

La situación ideal es plantear los flujos ideales de animales, personal y material antes de llevar a cabo el diseño de nuestra zona de cirugía experimental. Este diseño debe tener muy en cuenta el tipo de animales con los que trabajamos y las exigencias de nuestros usuarios. Por otra parte, nuestro diseño debe cumplir con el criterio de flexibilidad que permita adaptarnos a las nuevas exigencias que nos planteen los usuarios en cuanto a especies animales con las que trabajar y técnicas experimentales a llevar a cabo (ver Figura 5).



Imagen suministrada por la autoría

Figura 5.- Propuesta de diseño de una zona quirúrgica experimental.

En un posible diseño ideal, debemos separar los flujos de personal, animales y materiales entre sí, siempre que sea posible (ver Figura 6).

El personal usuario deberá pasar por un vestuario o barrera para que se vista con ropa limpia y exclusiva de la zona quirúrgica experimental. Tras este paso, deberá pasar por la zona de lavado quirúrgico (ver Figura 7) para luego acceder al quirófano experimental. Una vez realiza la cirugía, podría volver al vestuario para cambiarse de ropa y salir de la zona.



Imagen suministrada por la autoría

Figura 6.- Flujos de material, personal y animales en la zona quirúrgica experimental.



Imagen suministrada por la autoría

Figura 7.- Zona de lavado quirúrgico.

Los animales pueden ir desde la zona de estabulación a una sala de preparación en la que podrán ser rasurados, lavados y preparados para la técnica quirúrgica. En el caso de pequeños animales, en esa misma sala se pueden llevar a cabo procedimientos invasivos sin necesidad de entrar en el quirófano. Los animales de mayor tamaño se trasladarán a quirófano para ser intervenidos y serán devueltos a una sala de cuidados intensivos y/o de recuperación tras la intervención, por si fueran necesarios cuidados especiales antes de ser devueltos a la zona de estabulación. El acceso de la sala de preparación al quirófano debería hacerse a través de puertas automáticas.

El material estéril y limpio será almacenado en un lugar adecuado para que una vez utilizado en quirófano, sea devuelto a este almacén previo paso por una zona de lavado y esterilización

Panorama

de material quirúrgico. Los equipos de electromedicina deberán almacenarse en algún almacén limpio y cercano al quirófano experimental.

EQUIPAMIENTO

El equipamiento de las diferentes áreas de la zona experimental debe estar adaptado a los procedimientos y especies animales con las que se trabaje. Además, debe encontrarse lo más integrado posible en cada sala, permitiendo un flujo de personal, material y animales seguro y cómodo, facilitando las operaciones a realizar.

En la sala de preparación de animales para la cirugía debemos disponer de tomas de agua fría y caliente, desagüe, conexiones de gases medicinales, vacío y extracción de gases anestésicos, así como conexiones eléctricas suficientes para llevar a cabo cualquier procedimiento. Esta sala dispondrá de una mesa para preparar los animales, así como para poder realizar procedimientos en ella. Puede contar con lámpara quirúrgica portátil o fija (ver Figura 8) y estanterías para material.



Figura 8.- Lámpara quirúrgica.

Imagen suministrada por la autoría

En el quirófano experimental, contaremos con conexiones para gases medicinales, vacío, extracción de gases anestésicos, tomas de agua caliente y fría, conexiones eléctricas conectadas a SAI y con tomas de tierra incorporada, conexiones telefónicas y de datos informáticos. Es conveniente disponer de conexiones para poder enviar señal de vídeo o audio fuera del quirófano experimental. Muchas de las conexiones eléctricas y de gases medicinales pueden estar integradas en brazos articulados para

aumentar la versatilidad de la instalación. En un quirófano se puede disponer de tantos brazos articulados como puestos quirúrgicos se deseen plantear. Es fundamental el disponer de lámparas quirúrgicas ancladas al techo que aporten una luz regulable en el campo quirúrgico. Cada vez es más frecuente la instalación de sistemas que integran en un mismo control diferentes partes del quirófano: iluminación, posición de la mesa quirúrgica, insufladores... Estos sistemas pueden ser controlados por voz, por ejemplo, y permiten reconocer usuarios diferentes para ofrecerles configuraciones del quirófano adaptadas a sus necesidades. Dispondremos de equipo de anestesia portátil y, además, podemos contar con equipos de magnificación visual (microscopio quirúrgico) para llevar a cabo intervenciones microquirúrgicas, equipos de laparoscopia, endoscopia, fluoroscopia y otros equipos según nuestras necesidades (ver Figura 9).



Imagen suministrada por la autoría

Figura 9.- Mesa quirúrgica, equipo de anestesia portátil y equipamiento para cirugía laparoscópica.

En la sala de recuperación de animales tras la cirugía podemos contar con microambientes controlados para el restablecimiento de los animales. Contaremos con conexiones de gases medicinales, vacío y extracción de gases anestésicos para alimentar a un equipo de anestesia inhalatoria portátil (ver Figura 10).

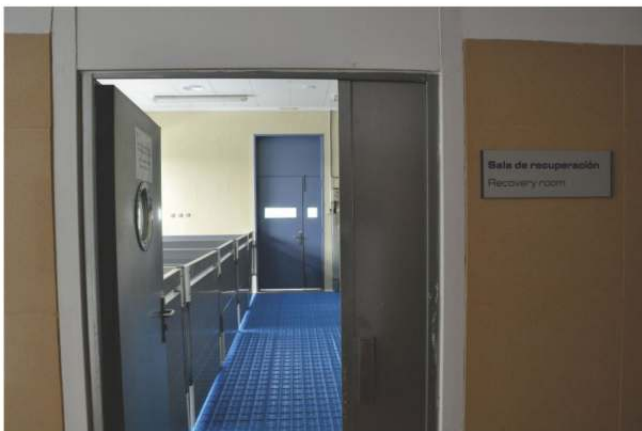


Imagen suministrada por la autoría

Figura 10.- Sala de recuperación tras el procedimiento quirúrgico para grandes animales.

BIBLIOGRAFÍA

- NIH Design Requirements Manual. The formulae for building state of the art biomedical research facilities. Division of Technical Resources, 2008.
- Estándares y recomendaciones. Bloque Quirúrgico. Ministerio de Sanidad y Política Social, 2009.
- UNE 100713:2005. Instalación de acondicionamiento de aire en hospitales. AENOR, 2005.
- UNE-EN ISO 14644-1:2000. Salas limpias y locales anexos. Parte 1: Clasificación de la limpieza del aire. AENOR, 2000.
- UNE-EN ISO 14644-5:2005. Salas limpias y locales anexos controlados. Parte 5: Funcionamiento. AENOR, 2005.
- Guía de Buenas Prácticas para la Seguridad y la Sostenibilidad del Área Quirúrgica. Generalitat de Catalunya. Departament de Salut, 2012.



**ESTAMOS
EN EL CENTRO DE LA
DIVULGACIÓN
CIENTÍFICA
EN HABLA HISPANA**

¡PAUTE CON NOSOTROS!
Su empresa también puede ser parte de la SECAL.





Cuidadores en Barrera II del CNIO

Alba Sanz y Rebeca Barrero
Cuidadoras en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas

Somos Alba Sanz y Rebeca Barrero, dos cuidadoras y compañeras de Paloma García del Centro Nacional de Investigación Oncológicas. Nos introducimos en este mundo tan interesante gracias a nuestros estudios de técnico de anatomía patológica y de veterinaria, respectivamente.



Imagen suministrada por la autoría

Como ya os contó Paloma, el animalario de este centro de investigación se divide en varias zonas: Barrera I, Barrera II, Biomódulos, Ranario y Lavado, y uno de los primeros artículos fue como trabajan en Barrera I.

Nuestro día a día transcurre en Barrera II, otra parte del gran animalario de este centro y bastante distinta. Está compuesta por una sala diáfana con 16 racks ventilados, un laboratorio, la zona de duchas de entrada y salida, y la sala de autoclaves. Al igual que Barrera I es una zona SPF (*Specific Pathogen Free*), pero todo lo demás es completamente diferente.

Los animales que cuidamos aquí son solamente ratones y, a diferencia de los de Barrera I, están estabulados en racks ventilados. Estos racks están compuestos por un motor que se encarga de coger el aire de la sala, filtrarlo por filtros HEPA y otros prefiltros para después repartirlo por las distintas cubetas de cada rack (exactamente 112 cubetas), y después el aire "sucio" hace todo el proceso en sentido contrario.

Aproximadamente, cuidamos de 6000 ratones, que llegan aquí de Barrera I o del exterior (inmunodeprimidos) para ser tratados con diferentes procedimientos (como por ejemplo, infectados con Adenovirus, Bleomicina, Xenograft, etc.) Tenemos que estar atentas a que estos ratones enfermen y lleguen a un determinado estado, para así poder avisar a los técnicos responsables y que ellos determinen su futuro.



Imagen suministrada por la autoría

Lo siguiente que vamos a contaros es lo que hacemos desde que entramos a las ocho de la mañana hasta que a las cinco de la tarde termina nuestra jornada laboral.

Cuando llegamos a primera hora, entramos al vestuario y sacamos la ropa sucia de los días anteriores para mandarla a lavar y controlamos que el vestuario esté en orden y que no falte material para que la gente vaya vestida correctamente (traje

estéril, calzas, mascarilla, gorro y guantes) para acceder a esta zona a través de las duchas de aire.

Una vez dentro, nos calzamos y lo primero que hacemos es sacar el autoclave y el VHP (ciclo de peróxido) que contienen absolutamente todo el material necesario para trabajar dentro de Barrera II.



Imagen suministrada por la autoría

Después, vamos al laboratorio para ponernos al día con el correo, recoger, reponer y limpiar. Acto seguido, nos disponemos a cambiar cubetas. A diferencia de Barrera I, donde los animales se cambian todas las semanas, aquí los cambiamos cada 15 días debido al gran volumen de cubetas y únicamente nos encargamos de esto nosotras dos (por ejemplo, en Barrera I son 12 cuidadores). El cambio consiste en pasar los ratones de la cubeta en la que se encuentran a una limpia, pasándolos uno por uno y desinfectándonos las manos entre cada cubeta. En el cambio de cubetas tenemos que prestar atención a que corresponda el número de animales y el sexo de los mismos con la tarjeta identificadora, que nos muestra a parte de estos datos, el ID de los

Al cuidado

ratones (línea y número de identificación), descripción de línea, proyecto al que pertenecen, procedimiento al que están sometidos, dietas especiales tanto en bebida como en comida... también estamos pendientes de que tengan comida para 15 días y enriquecimiento para asemejarlo lo más posible a su hábitat natural. Aparte de todo lo anterior, tenemos que tener especial cuidado con el estado de los ratones dependiendo del procedimiento y/o tratamiento en el que se encuentren, ya que somos el primer filtro que valora el estado del ratón y sus patologías. Si encontramos alguna de éstas, lo identificaremos con una tarjeta especial en el tarjetero y después nos encargaremos de registrar las mismas en la base de datos para que quede constancia.

Una vez terminado el cambio de cubetas, limpiaremos la campana para que no quede ningún resto de suciedad de los ratones que se han manipulado en el día, y llevaremos el material sucio a la zona de autoclaves.

Nuestra siguiente tarea diaria será cambiar los biberones de los racks correspondientes al día del cambio. Los biberones sucios los llevaremos también a la zona de autoclaves junto con las cubetas sucias. Y ya por último, revisaremos todas las cubetas de los racks que componen Barrera II. Junto con la revisión apuntaremos los valores de impulsión, extracción, temperatura y humedad que hay en cada motor y en la sala.

Todo el material sucio se sacará por la zona de autoclaves, para que los compañeros de lavado se encarguen de procesarlo y al día siguiente podamos disponer de este material otra vez limpio.

¡Por fin ha llegado nuestra hora de comer a las tres de la tarde!

Después de este descanso, volveremos al vestuario para revisar de nuevo el material que se ha gastado durante el día y volver a reponerlo. Y ya por último, vamos al almacén donde tenemos que hacer el enriquecimiento y preparar el material que los chicos de lavado se encargan de poner en el autoclave o VHP.

¡Y ya por fin nos han dado las cinco de la tarde y nos marchamos a casa, cansadas pero contentas de colaborar por un futuro mejor para la investigación!

Por último, aunque de cara al público nuestro puesto no sea el más mencionado, nos sentimos un pilar fundamental de este mini mundo, poco apreciado por la sociedad pero muy importante para nuestro futuro.





Dietas
Lechos y Virutas
Jaulas y Racks
Sistemas acuáticos

Equipos
Enriquecimiento
Distribución
Soporte técnico

¿Qué sabemos de *Helicobacter* spp.?

Begoña Peñalba, MSc

Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB)

Definir el estado sanitario de un animalario es una decisión complicada y es función del veterinario establecer los criterios que se ajusten al bien común de los distintos grupos de investigación que trabajan en el mismo centro.

Así como los organismos patógenos son directamente inaceptables, existen organismos oportunistas, cuya patogenicidad se manifiesta en ciertas ocasiones, que dependiendo de las necesidades de producción de las líneas transgénicas y del tipo de estudios pueden ser aceptados y controlados en el perfil sanitario de un animalario. Uno de estos microorganismos es *Helicobacter* spp., a quién vamos a dedicarle esta sección.

En un inicio, las recomendaciones de la Federación Europea de Asociaciones de Animales de laboratorio (FELASA) no incluían *Helicobacter* spp. en la lista de organismos importantes a tener en cuenta en los controles sanitarios periódicos. Las últimas revisiones de estas recomendaciones incluyen actualizaciones de nuevos conocimientos científicos sobre algunos agentes infecciosos, como por ejemplo *Helicobacter* spp., y las técnicas de diagnóstico. Esta reciente incorporación y el intercambio constante de animales entre centros de investigación colaboradores explicarían la prevalencia de *Helicobacter* spp. en el ratón de laboratorio. Un estudio realizado sobre 34 proveedores (comerciales e instituciones académicas) en Canadá, Europa, Asia, Australia y Estados Unidos demuestra que el 88% de estos centros tienen colonias de ratones infectadas con una o más especies de *Helicobacter* [1]. Otra publicación señala que por lo menos 1 de cada 5 especies de esta bacteria se detecta en un 88% de las 40 cepas de ratón testadas [2]. A pesar de esta elevada prevalencia, no hay que alarmarse y hay que entender lo que significa un signo + en la casilla de *Helicobacter* spp. en el informe del chequeo sanitario que envía el laboratorio de patología.

Las especies del género *Helicobacter* se caracterizan por ser Gram negativas, móviles y con una forma característica de hélice, curvadas o cocoides (ver Figura 1).

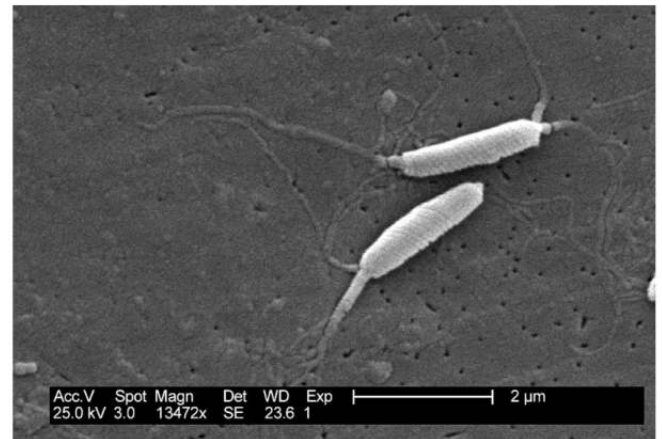


Imagen suministrada por la autoría

Figura 1.- Imagen mediante microscopía electrónica de *Helicobacter* spp.

Actualmente existen más de 10 especies de *Helicobacter* descritas en rata y ratón:

- **Rata:** *H. bilis*, *H. muridarum*, *H. rodentium*, *H. trogontum* y *H. typhlonius*.
- **Ratón:** *H. bilis*, *H. ganmani*, *H. hepaticus*, *H. muridarum*, *H. mastomyrinus*, *H. rappini*, *H. rodentium*, *H. typhlonius*, *H. trogontum*, *H. apodemus* y *H. mastomyrinus*.

De todas estas especies, las únicas que se asocian con enfermedad clínica son *H. bilis* y *H. hepaticus*. Ambas colonizan conductos biliares dando lugar a necrosis, colangitis o colangiohepatitis crónica. También están asociadas a enfermedad inflamatoria intestinal.

La especie que causa enfermedad en las personas y la más ampliamente estudiada es *H. pylori*, que infecta al epitelio gástrico humano. La investigación de la influencia patógena de estos microorganismos en humanos ha sido de gran interés durante la última década y ya se han identificado *H. hepaticus* y *H. bilis* en humanos con enfermedades hepatobiliares [3], aunque no está demostrado que sea una zoonosis comprobada.

En general, *Helicobacter spp.* coloniza la mucosa de colon y ciego y se excreta con las heces, con lo que la vía de transmisión es feco-oral. El uso de cubetas estáticas con tapa de filtro es suficiente para prevenir la transmisión entre cubetas. No está descrita la transmisión vertical.

El diagnóstico mediante cultivo no es el método más recomendado debido a que su crecimiento depende de muchos factores, como la experiencia del técnico de laboratorio, la manipulación rápida y apropiada de la muestra, el medio de cultivo adecuado y fresco, así como un ambiente de incubación microaerófilo. El diagnóstico serológico de la infección por *Helicobacter* también es posible, pero no existen test comerciales disponibles porque aunque el ensayo es sensible, no es específico y no está claro si la colonización intestinal por *Helicobacter spp.* incita la respuesta de anticuerpos. Por el contrario, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es posible detectar el ácido desoxirribonucleico de *Helicobacter spp.* convirtiéndose en la herramienta más sensible y específica para el diagnóstico de *Helicobacter*. Básicamente hay dos tipos de técnicas: una PCR especie-específica que permite la identificación de especies concretas de *Helicobacter* y una PCR grupo-específica que detecta varias especies en una misma prueba [2]. Si en el informe del chequeo sanitario las muestras salen positivas a la PCR grupo-específica, el siguiente paso sería solicitar la identificación de las especies presentes en la muestra mediante la PCR especie-específica. Sólo así podemos tomar las medidas adecuadas.

Según estudios publicados, el ADN de *Helicobacter* es común en muestras fecales (86%) y en tejido gástrico (55%), mientras que las muestras de tejido hepático (21%), intestino delgado (17%) y sangre (14%) suelen ser menos positivas [4]. Si existe el interés de conocer la presencia de *Helicobacter* en una colonia, es suficiente con enviar un *pool* de muestras de heces de ratones recogidas en distintos momentos del día, ya que la eliminación de la bacteria puede ser intermitente.

La mayor parte de los animales inmunocompetentes

portadores de *Helicobacter spp.* son asintomáticos, pero los inmunodeficientes pueden manifestar diarrea y prolapso rectal secundario a tiflitis o tiflocolitis con hiperplasia de la mucosa [5]. También se ha observado una reducción de la fertilidad. En el diagnóstico diferencial del prolapso rectal en ratones habría que incluir, además de infección por *Helicobacter spp.*, la infección por otros tipos de bacterias, endoparásitos e incluso disbiosis, que provocan hiperplasia de mucosa de intestino grueso y prolapso rectal (ver Figura 2).



Imagen suministrada por la autoría

Figura 2.- Ejemplo de la presentación clínica de prolapso rectal en un ratón de laboratorio. Se aprecia la inflamación de la mucosa rectal. Pueden presentarse hemorragias y con frecuencia se adhieren a la mucosa fragmentos de viruta.

Existen cepas transgénicas que presentan enfermedad intestinal inflamatoria (como *IL10*, *Rag1* y *Rag2 knockout*), en las que se ha observado mayor incidencia de prolapso rectal y presencia de lesiones más severas cuando se identifica la presencia de *Helicobacter spp.*

Cepa	<i>Helicobacter spp.</i> implicada	Tumor
BALB/c-IL10 ⁺	<i>H. hepaticus</i>	Carcinoma de colon
IL10 ^{-/-} (C57BL/6)	<i>H. typhlonius</i> , <i>H. rodentium</i> , <i>H. hepaticus</i>	Carcinoma de colon
Mdr1a ^{-/-}	<i>H. hepaticus</i> , <i>H. bilis</i>	Carcinoma de colon
Rag2 ^{-/-}	<i>H. hepaticus</i>	Carcinoma de colon
A/JCr	<i>H. hepaticus</i>	Carcinoma hepatocelular
Smad3	<i>H. hepaticus</i> , <i>H. bilis</i>	Carcinoma de colon

Imagen suministrada por la autoría

Tabla 1.- Modelos de roedores de la asociación entre presencia de *Helicobacter* y cáncer gastrointestinal y hepático [7].

Control Sanitario

En algunas cepas transgénicas la presencia de *Helicobacter spp.* puede estar asociada al desarrollo de tumores (ver Tabla 1). Recientemente se ha sugerido que la respuesta inflamatoria hacia *Helicobacter* puede además alterar la carcinogénesis mamaria en ratón [6].

El manejo de colonias libres de *Helicobacter spp.* implica en primer lugar un control estricto de los animales importados, permitiendo sólo la entrada de animales libres de *Helicobacter*. Las prácticas de manejo deben impedir las fuentes de contaminación y la vigilancia de los animales centinela. Una vez que se toma la decisión de mantener las colonias libres de *Helicobacter*, la estrategia más rápida y de mayor éxito es la repoblación con animales libres de *Helicobacter* o la rederivación de líneas genéticas únicas. Como los ratones neonatos adquieren la infección al poco tiempo de nacer, existe la posibilidad de realizar el *cross-fostering*, que consiste en transferir las camadas a madres adoptivas libres de *Helicobacter* en las primeras 24 horas de vida.

Varios estudios han evaluado la administración oral de antibióticos para erradicar *H. hepaticus* o *H. bilis* en ratones combinando amoxicilina o tetraciclina con metronidazol [8]. Aunque los animales mejoran, se observa que la infección persiste y los efectos de la antibioterapia en la microbiota propia del animal no compensan. También existen en el mercado dietas comerciales con formulaciones para la eliminación de la infección, pero tampoco resultan eficaces y tienen un coste elevado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Taylor N.S., Xu S., Nambiar P., et al. *Enterohepatic Helicobacter species are prevalent in mice from commercial and academic institutions in Asia, Europe, and North America.* J Clin Microbiol. 2007, 45:2166-72.
2. Bohr U.R., Selgrad M., Ochmann C., Backert et al. *Prevalence and spread of enterohepatic Helicobacter species in mice reared in a specific-pathogen-free animal facility.* J Clin Microbiol. 2006, 44(3):738-42.
3. Mateos-Muñoz B., Pérez-de-la-Serna J., Ruiz-de-León A., et al. *Helicobacter enterohepáticos distintos de Helicobacter pylori.* Rev. esp. Enferm. Dig. 2013, 105(8):477-84.
4. Nilsson H.O., Ouis I.S., Stenram U., et al. *High prevalence of Helicobacter Species detected in laboratory mouse strains by multiplex PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and pyrosequencing.* J Clin Microbiol. 2004, 42(8):3781-8.
5. Miller C.L., Muthupalani S., Shen Z., et al. *Isolation of Helicobacter spp. from mice with rectal prolapses.* Comp Med. 2014, 64(3):171-8.
6. Lakritz J.R., Poutahidis T., Mirabal S., et al. *Gut bacteria require neutrophils to promote mammary tumorigenesis.* Oncotarget. 2015, 6(11):9387-96.
7. Chichlowski M. and Hale L.P. *Effects of Helicobacter infection on research: the case for eradication of Helicobacter from rodent research colonies.* Comp Med. 2009, 59(1):10-7.
8. Whary M.T. and Fox J.G. *Detection, eradication, and research implications of Helicobacter infections in laboratory rodents.* Lab Anim. 2006, 35(7):25-36.



¡HAZTE SOCIO!

¡Tu apoyo es muy importante para nosotros!



Granja
San
Bernardo

*Minimal Disease
Level Rabbits*

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

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

Isabel Blanco Gutiérrez

Responsable del Servicio de Animalario del Centro Nacional de Investigación Oncológica y veterinaria especialista en salud y bienestar animal (Funciones EyF)

¿Desde cuándo eres socia de SECAL y qué opinión te deja nuestro colectivo?

Soy socia desde el año 2002, tras una visita al animalario del Centro de Biología Molecular, donde estaba Javier Palacín como responsable del animalario. Recuerdo que me hablo maravillas de la SECAL, y la verdad es que no puedo estar más de acuerdo con él. Es increíble lo que se ha logrado en tan solo 25 años, gracias al empuje de personas que sólo pensaron que el conocimiento de uno mismo debe servir para mejorar la Sociedad. ¡Y vaya si lo han logrado!..... Esta revista es un buen ejemplo de ello.

¿Cuál ha sido tu trayectoria profesional en el ámbito del animal de laboratorio?

Creo que, como muchos de nosotros, por pura casualidad, ya que jamás pensé cuando estudiaba veterinaria que iba a dedicarme al animal de laboratorio y además iba a disfrutar mucho trabajando. Desde tercero de carrera, y mejor no digo el año, entre como alumna interna en el Departamento de Sanidad Animal en el grupo de Jose Luis Blanco y Marta Eulalia García, donde estuve unos cuantos añitos y donde, tras terminar la carrera, pude conseguir una beca. Gracias a ellos, con los que mantengo relación desde esos años de estudiante, supe que necesitaban a un licenciado en veterinaria con experiencia en microbiología en el Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA), un animalario nivel P3 de Seguridad Biológica en Valdeolmos, para trabajar en un Proyecto Europeo sobre la Enfermedad de Glässer en lechones producida por *Hemophilus parasuis*, y para allí me fui. Hice una sustitución de verano de la jefa del animalario del centro y posteriormente por un problema de alergia me ofrecieron dirigirlo. Mi primera respuesta fue no, sólo pensaba: ¡pero si no tengo ni idea!.....y así empecé. Me apunté al Máster en Bienestar y Salud Animal tras el primer congreso en San Sebastian de la SECAL al que fui, y empecé sin quererlo, poco a poco, a especializarme en este mundo hasta terminar en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas donde empecé en el 2006, y donde estoy actualmente contratada por la empresa



Imagen suministrada por la autoría

Vivotecnia como jefa del Servicio de Animalario.

Entrando en el detalle ¿cuáles es la misión del CNIO?

Pues fácil respuesta, en la web del CNIO encontrarás que el objetivo es trasladar los descubrimientos científicos a métodos novedosos y más eficaces para prevenir, diagnosticar y tratar el cáncer... Pero por supuesto, es algo más. Aquí me encontré con muchas personas que adoran la Ciencia y que quieren ser los mejores en su campo, trabajando por avanzar.

¿Cómo es el proceso, “Modelo animal con diana cáncer, traducción de resultados y desarrollo de medicamentos” que se lleva en el CNIO?

El proceso se basa en la cooperación de los grupos, en la gran cantidad de seminarios, charlas y eventos que logran la interrelación de todos y así puedan surgir colaboraciones y proyectos, que unan el modelo animal de cada grupo de investigación de los programas de Oncología Molecular y Biología celular del Cáncer con el programa de Terapias experimentales e Investigación Clínica, que a la vez colaboran con empresas farmacéuticas. Todo ello unido a la existencia de un Programa de Biotecnología altamente especializado con 9 Unidades de Investigación diferente. Gracias a Dios, no se pretende que el del animalario sepa de todo. Existe una experta en la Unidad de Transgénicos, Sagrario Ortega; nuestra patóloga, Alba de Martino en la Unidad de Histopatología; y Francisca Mulero, médico nuclear y jefa de la Unidad de Imagen Molecular. Es una unión casi perfecta entre biólogos, químicos, médicos y veterinarios.

Gestionar 45.000 ratones en un momento dado puede ser como cuando una célula se divide de manera descontrolada... ¿cuáles pueden ser los trucos en la gestión de un animalario tan importante como el del CNIO?

Sin duda, tener un equipo maravilloso de cuidadores, técnicos, supervisores y veterinarios, gente entregada, y con ganas de trabajar. Eso sí, como anécdota, recuerdo mis dos primeros años en el CNIO como los más difíciles de toda mi carrera profesional por la exigencia de todos los grupos, por el nivel de este centro y por el volumen de trabajo del que ahora soy menos consciente. No soy de dar consejos pero es importante que te digas de vez en cuando, si otro puede yo también, que disfrutes mucho en tu trabajo y saber que solo no llegas a ninguna parte, además de tener un apoyo familiar que te haga ver qué es lo verdaderamente importante.

Paloma García forma parte del grupo editor de esta revista y también de tu equipo de trabajo. ¿Ves necesario fomentar la participación del personal cuidador en la actividad de la SECAL?

Por supuesto que lo veo necesario. No sé cuántas veces me han oído decir en el animalario que sin los cuidadores no somos nadie. Si el equipo de cuidadores no funciona, olvídate porque tu unidad no va a funcionar.

Por ello creo que en la Junta de SECAL debería existir una persona que representara a esta parte de la sociedad, a técnicos y cuidadores, para que entendamos sus necesidades. Que, además, en todos los congresos, exista una sección dirigida sólo a ellos

para fomentar su participación, que salvo en la revista es actualmente nula... Tenemos que ser capaces de implicarles más, aunque muchas veces cueste mucho que participen.

¿Cuál crees que es la perspectiva de la investigación biomédica en los modelos de cáncer en España?

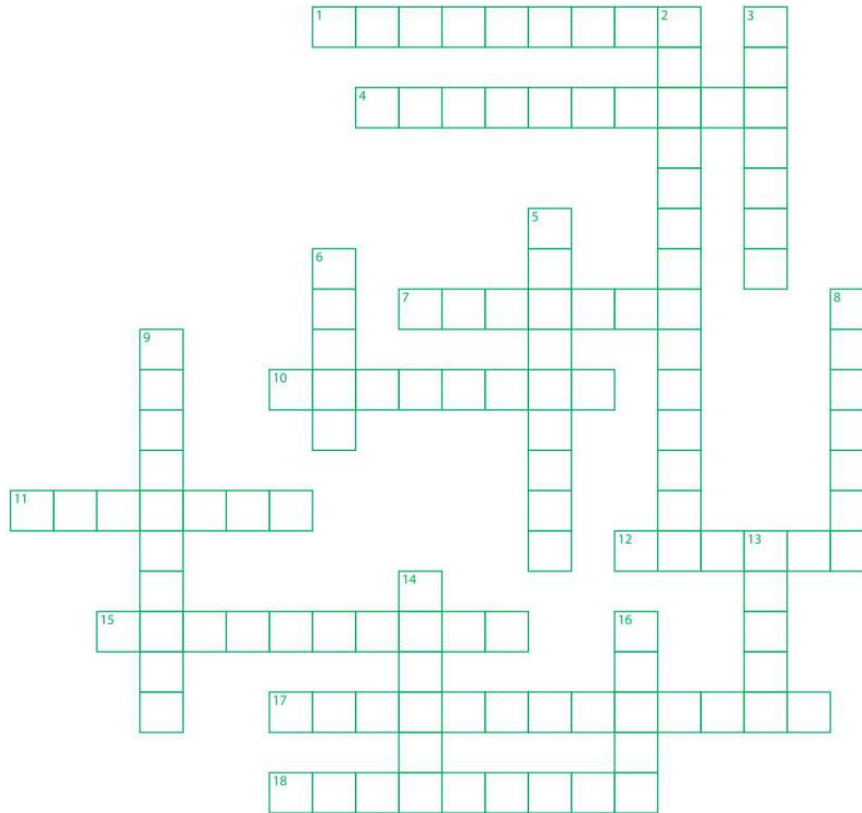
Pues en este tema desgraciadamente soy muy negativa y aunque parece que la cosa se va animando y los proyectos van llegando, por lo menos al CNIO, la ciencia en España esta relegada a la última posición en los presupuestos y mientras esto no cambie no se podrá hacer nada.

En concreto en este mundo de la experimentación animal, siguen saliendo normativas que aumentan la carga administrativa sin prever incremento de la dotación para personal, no sólo para los animalarios sino para la propia autoridad competente. Se deberían crear recomendaciones europeas de número de personal mínimo necesario según el volumen, la especie... Es ridículo pensar, como dice la normativa, que un solo responsable de salud animal pueda ser capaz de hacer su trabajo en este tipo de animalario. Lógicamente, la mayoría de los centros de este tamaño no tiene solo una persona sino que son varias.

Isabel, de parte de la dirección de la revista te queremos agradecer enormemente tu colaboración incondicional desde el primer momento que emprendimos este modelo de publicación; tu ayuda sin duda ha sido un soporte más en este proyecto. Ya puesto y en presión positiva ¿qué opinión te deja nuestra revista?

Tere y Hernan han logrado un equipo estupendo, entre las ideas tan creativas de uno y la experta mano de Tere para revisar, chequear y crear.

Yo creo que me habéis oído decirlo muchas veces: La calidad de esta revista permite actualmente que se pueda exportar a otros países y que sea la revista oficial y de referencia para otras sociedades iberoamericanas que no tienen revista. Con acuerdos entre los países, podemos lograr exportarla, llevando el conocimiento que hay en cada una de sus páginas a otros animalarios y que de otros países nos cuenten como son sus normativas, su día a día, y por supuesto sin olvidar la posibilidad de generar más ingresos para la SECAL que sirvan para disponer de más recursos para realizar cursos, charlas y jornadas; aquí lo siento, pero me ha salido la vena de tesorera.



Horizontal

1. Prueba utilizada para medir los niveles de actividad motora y ansiedad en roedores (voz inglesa).
4. Existencia de dos formas o dos aspectos anatómicos diferentes en una misma especie.
7. Conjunto de medidas técnicas, mecánicas y sanitarias dirigidas a evitar contaminaciones en cualquier sentido en un área de producción, mantenimiento o experimentación.
10. Organismo genéticamente modificado que carece de la expresión de un gen en particular.
11. Animal que tiene dos o más poblaciones de células genéticamente distintas que se originaron en diferentes cigotos.
12. Característica permanente que está presente a causa de la composición genética del animal.
15. Medidas adoptadas para la prevención de una enfermedad; es decir, todas las rutinas o procedimientos higiénicos, dietéticos o farmacológicos.
17. Administración de fluidos, generalmente atemperados, durante un procedimiento largo o al final de uno corto.
18. Parte de la biología que estudia el origen y el desarrollo progresivo de los seres vivos a fin de establecer las relaciones comunes de sus orígenes.

Vertical

2. Disminución del contenido de agua corporal total, producido por aporte insuficiente o pérdidas aumentadas de líquidos.
3. Muestra de tejido de un organismo vivo con fines diagnósticos.
5. Administración de líquidos a través de los vasos sanguíneos que los irrigan, desplazando la sangre que los ocupa.
6. Sustancia (generalmente proteína) localizada en cualquier parte de la célula con capacidad de reconocer un fármaco y producir una respuesta celular.
8. Volumen total de sangre circulante.
9. Registro de variables fisiológicas de animales conscientes y con libertad de movimiento.
13. Término utilizado para denominar a las bandas alternas de color claro y oscuro en cada eje del pelo.
14. Experimentos o medidas realizados en o sobre tejidos biológicos, en un ambiente artificial fuera del organismo con las mínimas alteraciones de las condiciones naturales.
16. Red española de responsables de bienestar animal.

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



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.crl.com



Positive Discovery

Welcome to a world in which every research model is designed to enhance a life – a world in which animal care is of paramount importance and our customers are at the heart of everything we do at Envigo.

Working together with our customers, Envigo is creating the foundations to a world in which human lives are improved and scientific knowledge is advanced on a daily basis.

Discover your own positive outcomes at Envigo today.

envigo.com

