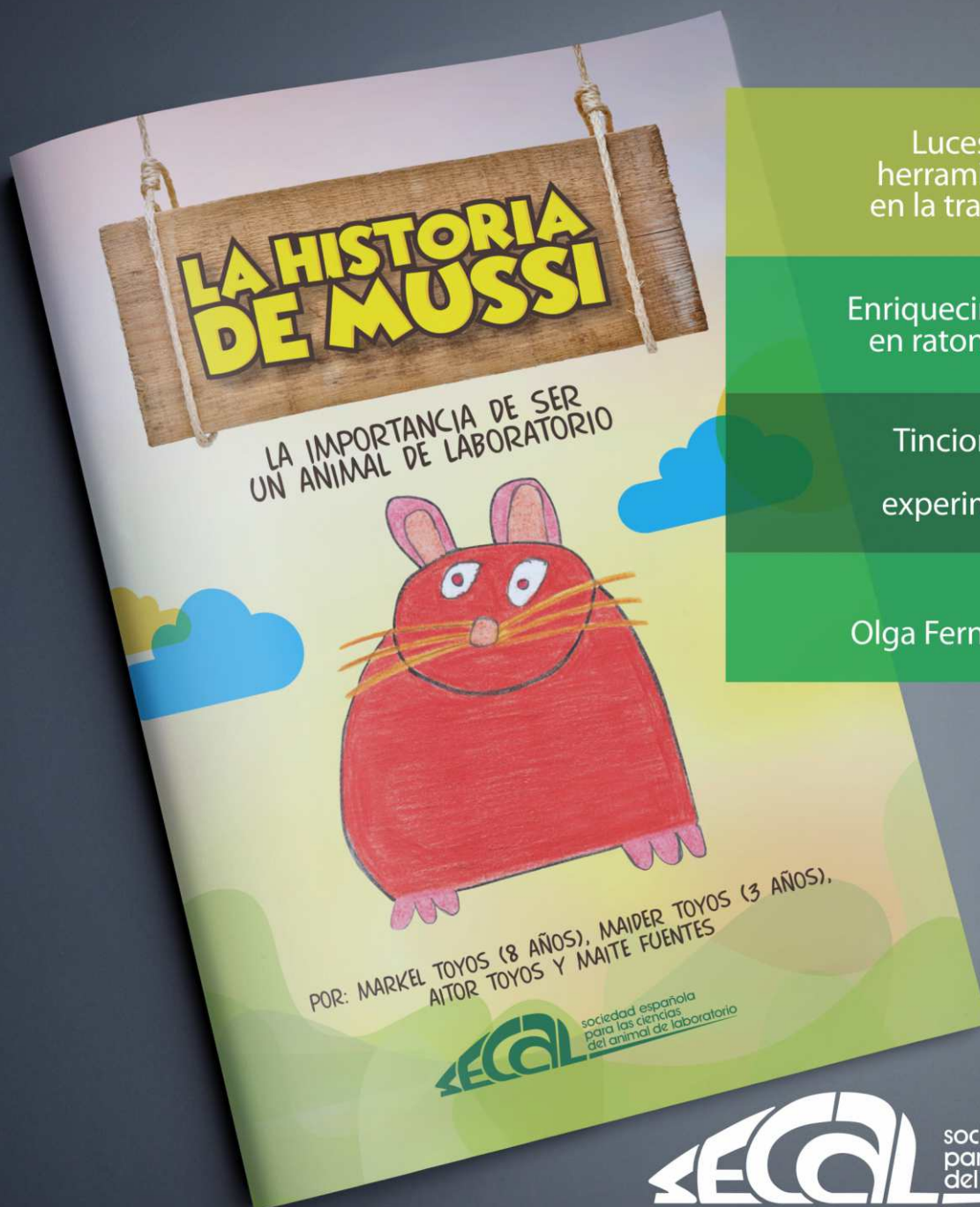


REVISTA DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA PARA LAS CIENCIAS DEL ANIMAL DE LABORATORIO

ANIMALES DE LABORATORIO

Otoño 2017. Número 75



Luces y sombras de las herramientas CRISPR/Cas en la transgénesis animal.

Enriquecimiento ambiental en ratones de laboratorio.

Tinciones histoquímicas de utilidad en experimentación animal.

Entrevista
Olga Fernández Rodríguez.



+++
ENVIGO

At Envigo, the positives are
in more than just our name

Introducing SHrN[®]

The most immunodeficient hairless model available.

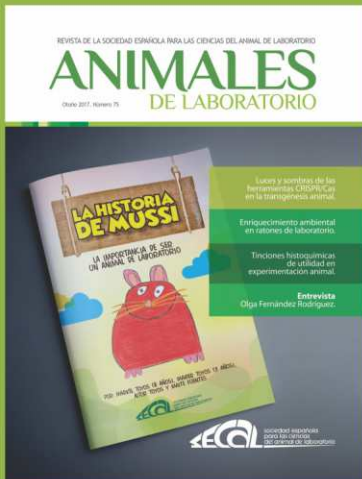
With a level of immunodeficiency that goes beyond other traditional hairless SCID mice and with fewer dendritic cells than all triple-deficient models, the SHrN brings a new option to oncology and immunology researchers. And, with no need for shaving, you'll save time and effort.

Download Advances in immunodeficient models white paper at envigo.com/shrn-paper



envigo.com

Grupo Editor



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

www.secal.es

DIRECTORA

Lara Sedó
larasedo@ub.edu

SUBDIRECTOR

Hernán Serna
Hserna@binaex.com

EDITORES DE ESTILO E IMAGEN

Olga Fernández
omfr75@yahoo.es

PUBLICIDAD

David Mayo
publicidad.revista@secal.es

FOTO DE PORTADA

Suministrada por Secal

DISEÑO Y MAQUETACIÓN

CONEXION E.P.

www.agenciaconexion.com.co

IMPRIME

LPG
lpgtextil@gmail.com

DEPÓSITO LEGAL

M-1362-1999

Avatar

No ha sido fácil mejorar lo que ya teníamos como documento divulgativo de la SECAL.

Durante estos años de reflexión estética contemporánea, los artículos reunidos aquí han recorrido desde el factor humano que indaga el alcance de su rol en el trabajo y día a día, hasta las técnicas y propuestas más avanzadas dentro del marco de la experimentación animal.

A lo largo de estos años, nuestro fenotipo ha cambiado como es normal en un organismo vivo con un grupo editor variopinto. De la misma manera, nuestro genotipo también se ha modificado, manteniendo eso sí en su fondo la combinación del trabajo ya hecho, con las nuevas incorporaciones al gen. Somos un Quimera producto de un sueño llamado Revista Animales de Laboratorio de la SECAL.

La historia va del blanco y negro al color, del poco gramaje de papel a uno robusto y estucado, del cambio de tamaño hasta una nueva propuesta editorial. Propuesta esta última que no para de crecer y mutar en forma de Secciones que dan cuerpo alma y carácter propio a nuestra publicación.

Damos la bienvenida a las nuevas secciones, que forman parte del plan trazado hace ya unos cuantos números atrás, y que son el futuro del objetivo divulgativo científico de nuestra publicación, nuestro ADN.

Dirección Revista SECAL

EDITORIAL

JUNTA DE GOBIERNO

PRESIDENCIA

Teresa Rodrigo Calduch (2015-2019)

SECRETARÍA

Clara Muñoz Mediavilla (2015-2019)

TESORERÍA

David Muñoz Valverde (2015-2019)

VOCALÍAS

Helena Paradell Trius (2015-2019)
Hernán Serna Duque (2015-2019)
Sergi Vila Bellmunt (2015-2019)
José Luis Martín Barrasa (2015-2019)

VICEPRESIDENCIA

Isabel Blanco Gutiérrez (2017-2021)

VICESECRETARÍA

Julia María Samos Juárez (2017-2021)

VICETESORERÍA

Viviana Bisbal Velasco (2017-2021)

Elena Hevia Hernández (2017-2021)
John Sparrowe-Gil Del Real (2017-2021)
David Mayo Lopez (2017-2021)
María Jesús Molina Cimadevila (2017-2021)

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.
- ▶ 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
- ▶ ZOONLAB GmbH
- ▶ ANIMALARIA FORMACIÓN y GESTIÓN, S.L.
- ▶ SODISPAN RESEARCH, S.L.
- ▶ COL.OFI. DE VETERINARIOS DE CADIZ
- ▶ TEMINOX C.B.
- ▶ CENTRO DE ESTUDIOS BIOSANITARIOS, S.L.
- ▶ FLOVIGAS, S.A.



SOCIOS
BENEFACTORES



Directora
LARA SEDÓ
larasedo@ub.edu



Subdirector
HERNÁN SERNA
Hserna@binaex.com



Editor de estilo e imagen
OLGA FERNÁNDEZ
omfr75@yahoo.es



Publicidad
DAVID MAYO
publicidad.revista@scal.es

RESPONSABLES DE SECCIÓN



Noticias Secal / Actualidad
CRISTINA GERBOLÉS FREIXAS
kgerboles@gmail.com



Técnicas
MARÍA GRANADA PICAZO
mpicazo@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
jimbarrasa@gmail.com



Libros y páginas web
SERGI VILA BELLMUNT
sergivilab@gmail.com



Factor Humano
JAVIER FIDALGO FERNÁNDEZ
fidalgo@ocelata.com



Al cuidado
DANIEL DEL OLMO
olmo@vivotecnica-ms.com



Panorama
LUIS MUÑOZ DE LA PASCUA
imp@usal.es



Control sanitario
SANDRA BARBOSA
sandra.barbosa@uab.cat



Reproducción y genética
GONZALO MORENO
g.moreno@umh.es



Anestesia y analgesia
JAVIER BENITO
benedictusvip@hotmial.com



In vitro
GUILLERMO REPETTO
grepkuh@upo.es



Bienestar animal
SÍLVIA CUFÍ
scufigonzalez@gmail.com



CEEA-OH
ALBERTO PASTOR
albertopastor@umh.es



Tinciones y tejidos
ANA NIETO
anieto@ugr.es

Han colaborado en este número:

Teresa Rodrigo, directora Unitat d'Experimentació Animal de Farmàcia i Unitat d'Experimentació Animal de Psicologia / **Rubén Mota**, veterinario responsable del CNIC / **Francisco J. Chamizo López**, servicio de Microbiología Hospital Universitario de Gran Canaria, Dr. Negrín / **M^a Xosé Fernández Macía**, Servicio de Experimentación Animal. Unidad de Investigación. Hospital Universitario de Gran Canaria, Dr. Negrín / **Ana Bordes Benítez**, Servicio de Microbiología Hospital Universitario de Gran Canaria, Dr. Negrín / **Carmen García Ortiz**, técnico superior en prevención de riesgos Laborales / **Oscar Zaragoza**, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III / **Sagrario Ortega**, Unidad de Ratones Transgénicos. Programa de Biotecnología, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) / **Ivan Ortega Sáez**, PCB-PRBB Animal Facility Alliance, Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB) / **Garikoitz Azkona**, PCB-PRBB Animal Facility Alliance, Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB).



Foto: pixabay

Un modelo al lado de los humanos

EN SU VISTA ESTÁN PUESTAS NUESTRAS ESPERANZAS DE REGENERACIÓN NERVIOSA.

La inestimable ayuda que el lagarto canario (*Gallotia galloti*) nos ofrece, reside en que su Sistema Nervioso Central (SNC) comparte características histofisiológicas comunes, tanto con especies capaces de regenerar espontáneamente su SNC (peces y anfibios) como con especies incapaces (aves y mamíferos). Científicos españoles han demostrado la recuperación tisular espontánea de la corteza cerebral y el recrecimiento axonal del nervio óptico de este lagarto, tras lesiones traumáticas.

El modelo regenerativo de *G. galloti* y de escasos reptiles, es el más cercano a mamíferos y está revelando las claves de la incapacidad regenerativa de los humanos hasta el momento.

EDITORIAL

14 ACTUALIDAD

- El aceite de oliva virgen contribuye a prevenir la disfunción testicular.
- Fármacos basados en la melatonina para luchar contra el Parkinson.
- Desarrollar mejores analgésicos para tratar el dolor articular.

20 ÉTICA Y LEGISLACIÓN

- Jordi Sabater Pi: Etólogo y primatólogo.

22 SEGURIDAD EN 5 MINUTOS

- Caídas: Soluciones inspiradas en la naturaleza para un riesgo habitual en los animalarios.

25 ¿Y TÚ QUÉ OPINAS?

- Dolor y Enterotoxemia.

29 BIENESTAR ANIMAL

- Enriquecimiento ambiental en ratones de laboratorio.

35 REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA

- Luces y sombras de las herramientas CRISPR/Cas en la transgénesis animal.

42 INVITRO

- Modelos alternativos en investigación de enfermedades infecciosas.

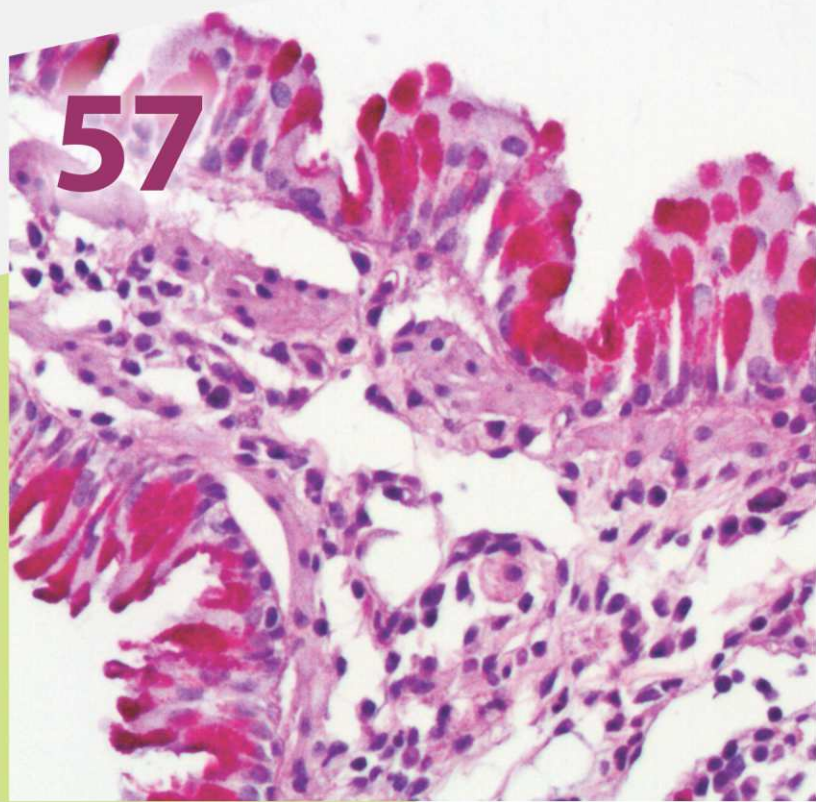
53 TINCIONES Y TEJIDOS

- Tinciones histoquímicas de utilidad en experimentación animal.

61 ENTREVISTA

- Olga Fernández Rodríguez.

57



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

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

*Una formación de calidad
para una investigación de
calidad*

*Su bienestar es nuestro
bienestar*

SECAL sociedad española
para las ciencias
del animal de laboratorio

Con la colaboración de SECAL



Animalaria

Formación y Gestión S.L.

www.animalaria.org Tel.699921930

LA HISTORIA DE MUSSI

POR: MARKEL TOYOS (8 AÑOS), MAIDER TOYOS (3 AÑOS),
AITOR TOYOS Y MAITE FUENTES

LA IMPORTANCIA DE SER UN ANIMAL DE LABORATORIO

ERASE UNA VEZ UN RATONCITO LLAMADO MUSSI. CIERTO ES QUE MUSSI ERA MUY FELIZ, PERO DESDE SIEMPRE HABÍA TENIDO UN SUEÑO; QUERÍA SER IMPORTANTE. CUANDO SU MADRE LE PREGUNTABA QUÉ QUERÍA SER DE MAYOR, ÉL SIEMPRE RESPONDÍA LO MISMO: QUIERO LLEGAR MUY LEJOS, QUE SIEMPRE ME RECUERDEN, ME GUSTARÍA SER DE MAYOR PRESIDENTE...

EL DÍA A DÍA DE MUSSI ERA EL SIGUIENTE: AL LLEGAR LA NOCHE EMPEZABA LA FIESTA, JUNTO CON SUS HERMANOS SE ENZARZABAN EN JUEGOS CON LOS "BISBALES" Y PEQUEÑOS TROZOS DE PAPEL QUE TENÍAN EN SU CASA. ÉSTA ERA MUY ESPACIOSA, EL SUELO ERA MUY CÓMODO PARA SUS PATITAS, TAN BLANDITO Y CONFORTABLE. SIEMPRE TENÍAN DISPUESTA SU SABROSA COMIDA, A MUSSI LE ENCANTABA AGARRARSE A UN PEDACITO Y ROER Y ROER TAN RICA COMIDA.

AL FONDO DE SU CASITA TENÍA SU GRIFO DE AGUA, AL LAMERLO LIGERAMENTE SALÍA UN AGUA LIMPIA Y RICA. YA CON EL ESTÓMAGO SACIADO, SIEMPRE ENCONTRABA DIVERSIÓN CON SUS HERMANOS, JUGUETEABAN ENTRE ALGODONES Y ESTRUCTURAS CONFORTABLES, COMO SI FUERAN PEQUEÑAS CASITAS EN LAS QUE SE REFUGIABAN Y SE ESCONDÍAN CUANDO QUERÍAN GUARECERSE.

AL AMANECER, LA LUZ APARECÍA POCO A POCO, ERA EL INDICADOR DE SU CANSANCIO. TAN PRONTO NOTABAN LA TENUE LUZ APARECER, SU CANSANCIO SE EMPEZABA A NOTAR. MUSSI Y SUS HERMANOS SE ACURRUCABAN SIEMPRE EN LA ESQUINA DEL FONDO DE SU CASA, ALLÍ ENTRE SUS ALGODONES ENCONTRABAN EL MERECIDO DESCANSO QUE SUS CUERPOS NECESITABAN.





CADA DÍA LA MISMA HISTORIA SE REPETÍA. AL CABO DE UNA HORA MÁS O MENOS DEL AMANECER, CUANDO MUSSI SE ENCONTRABA TAN A GUSTO CON SUS HERMANOS, OÍAN LA APERTURA DE UNA PUERTA Y NOTABAN APROXIMARSE A UNA PERSONA VESTIDA DE VERDE, LE LLAMABA "EL EXTRATERRESTRE".

APENAS SE LE VEÍA LA CARA PUESTO QUE IBA MUY TAPADA, PERO PARA MUSSI ESA PRESENCIA LE ERA TRANQUILIZADORA.

NORMALMENTE NO HACÍA MUCHO RUIDO CON LO QUE VOLVÍA A DORMITAR, PERO OTRAS VECES ERA COGIDO POR ESAS MANOS TAN DELICADAS Y DEPOSITADO EN UNA NUEVA CASA. ESTE HECHO A MUSSI NO LE ERA MUY GRATO PUES SIGNIFICABA QUE TENÍA QUE VOLVER A HACERSE SUS NIDOS EN LA NUEVA CASA, AUNQUE CIERTO ERA QUE TAMBIÉN LE RESULTABA DIVERTIDO DESPEDAZAR EL PAPEL Y HACERLO AÑICOS. DE VEZ EN CUANDO EL EXTRATERRESTRE LES HABLABA, ERA UNA VOZ SUAVE Y EL TONO QUE UTILIZABA LE AGRADABA SOBREMANERA A MUSSI. ERA COMO SU SEGUNDA MADRE.

AL CABO DE UNAS HORAS DEL AMANECER, DE NUEVO SE ABRÍA LA PUERTA Y APARECÍA OTRA PERSONA, ESTA VEZ VESTIDA DE BLANCO. EL BLANCO NO ERA EL COLOR PREFERIDO DE MUSSI, LE PARECÍA FRÍO Y CALCULADOR. EN CUANTO LE NOTABA ENTRAR SABÍA LO QUE OCURRIRÍA DESPUÉS, ¡SE IBAN DE VIAJE!, SU CASA SE MOVÍA, SE TRASLADABAN A OTRO LUGAR. ENTRABAN EN OTRA HABITACIÓN Y ALLÍ PASABAN LA MAÑANA. EL PERSONAJE BLANCO LES IBA COGIENDO UNO A UNO, MUSSI SOLÍA PONERSE ALGO NERVIOSO, LO QUE SENTÍA ERAN SENTIMIENTOS CONFRONTADOS; POR UN LADO, SABÍA QUE CUANDO LE TOCARA SU TURNO NOTARÍA UN PEQUEÑO PINCHACITO, POR ESO NO LE GUSTABA DEMASIADO. PERO POR OTRO LADO, EL DOLOR SE IBA DE INMEDIATO Y PREVIO A ESTE HECHO ERA COGIDO POR AQUELLA MANO, DE FORMA FIRME Y SEGURA, NO SABÍA POR QUÉ PERO A PESAR DE NO PODER MOVERSE POR SEGUNDOS, ENTRE AQUELLOS DEDOS SENTÍA SEGURIDAD. AL CABO DE UN RATO, UNA VEZ TODOS SUS HERMANOS PASABAN POR LA MANO, ERAN DEVUELTOS A SU CASA Y VOLVÍAN A SU LUGAR DE ORIGEN.



UN DÍA MUSSI NOTÓ ALGO ENTRE SUS HERMANOS, RESULTABA QUE DE TODOS ELLOS, EN TOTAL ERAN DIEZ, TRES SE ENCONTRABAN SIN GANAS DE JUGAR, NO SE SENTÍAN BIEN, ESTABAN CANSADOS. LA VERDAD ES QUE A PESAR DE NO DARLE IMPORTANCIA AL PRINCIPIO, DESDE HACÍA UN TIEMPO HABÍAN NOTADO QUE EN SU LOMO CREÍA UN BULTITO. SEGÚN IBA PASANDO EL TIEMPO, EL BULTITO CRECÍA Y SEGÚN IBA CRECIENDO, EL CANSANCIO SE SENTÍA EN MAYOR MEDIDA. SOBRE TODO EN SUS TRES HERMANOS MÁS DÉBILES.

LA PREOCUPACIÓN DE MUSSI IBA INCREMENTÁNDOSE, PUES LA DEBILIDAD DE SUS HERMANOS ERA CADA VEZ MAYOR. TAMBIÉN NOTÓ QUE LA PRESENCIA DEL EXTRATERRESTRE ERA MÁS HABITUAL, A LO LARGO DEL DÍA LOS VISITABA CON MÁS FRECUENCIA. MUSSI PUDO NOTAR SU PREOCUPACIÓN TAMBIÉN. DADO QUE SUS HERMANOS ENFERMOS NO PODÍAN LLEGAR A LA COMIDA, EL EXTRATERRESTRE COLOCÓ COMIDA HUMEDECIDA EN UN PLATITO CERCA DE LOS TRES HERMANOS PARA QUE PUDIERAN ESTAR BIEN ALIMENTADOS Y ASÍ PUDIERAN RECUPERARSE DE SU MALESTAR.

UN DÍA, AL POCO DEL AMANECEER, APARECIÓ EL PERSONAJE BLANCO, ERA MÁS PRONTO DE LO NORMAL, MUSSI ESTABA CUIDANDO DE SUS HERMANOS MÁS DÉBILES, HABÍA UNO QUE LE PREOCUPABA ESPECIALMENTE PUES LA NOCHE PASADA A PENAS SE HABÍA MOVIDO Y NO HABÍA TOMADO NADA DE AGUA NI COMIDA. INICIARON EL VIAJE A LA OTRA HABITACIÓN Y UNO A UNO EL PERSONAJE BLANCO FUE TOMANDO A CADA UNO DE LOS RATONCITOS. ESTA VEZ EL TIEMPO QUE PASABA CON CADA UNO ERA MAYOR. AL LLEGAR EL TURNO DE SU HERMANO MÁS DÉBIL, EL PERSONAJE BLANCO SE ALEJÓ DE LA JAULA CON SU HERMANO EN LA MANO, AL REGRESAR, SU HERMANO NO ESTABA, NUNCA MÁS VOLVIÓ A LA JAULA. A CONTINUACIÓN LES TOCÓ EL TURNO A LOS OTROS DOS HERMANOS DÉBILES. TARDARON MÁS TIEMPO DEL HABITUAL, PERO ESTOS DOS SÍ VOLVIERON A CASA. PASARON VARIOS DÍAS. MUSSI SENTÍA UNA GRAN TRISTEZA POR NO VER A SU HERMANO, PERO SIN EMBARGO SE ALEGRABA POR LA RECUPERACIÓN DE SUS OTROS DOS HERMANOS. A LA VEZ QUE SE IBAN SINTIENDO MEJOR, EL BULTITO DE SUS LOMOS IBA DESAPARECIENDO. LA NORMALIDAD HABÍA VUELTO A SUS VIDAS, LOS JUEGOS VOLVÍAN A SER MUY DIVERTIDOS AL CAER LA NOCHE Y APAGARSE LA LUZ.



UN DÍA, DURANTE LA ESTANCIA DEL EXTRATERRESTRE APARECIÓ EL PERSONAJE BLANCO. NORMALMENTE NO TENÍAN CONVERSACIONES LARGAS, SI SE ENCONTRABAN SE SALUDABAN Y POCO MÁS. PERO ESTA VEZ, EL TONO AL HABLAR ERA UN POCO MÁS ALTO, EL EXTRATERRESTRE LE DIO LA ENHORABUENA AL PERSONAJE BLANCO Y AMBOS ESTABAN MUY CONTENTOS. MUSSI NO ENTENDÍA LO QUE SUCEDÍA, PERO SEGURO ERA MUY BUENO.

AL CABO DE UN RATO EL PERSONAJE BLANCO SE MARCHÓ Y EL EXTRATERRESTRE SE QUEDÓ EN LA HABITACIÓN. TOCÓ CAMBIO DE CASA Y ESTA VEZ, AL ESTAR ENTRE LAS MANOS DEL EXTRATERRESTRE, CUANDO ESTABA ENTRE SUS DEDOS, SE LO PUSO A LA ALTURA DE SUS OJOS Y LE DIO LAS GRACIAS A ÉL Y A SUS HERMANOS.

MUSSI SENTIÓ UN ESCALOFRÍO POR EL CUERPO, Y EN LA EXPRESIÓN DE LOS OJOS DEL EXTRATERRESTRE ENCONTRÓ LA VERDAD.

LA VERDAD ES QUE GRACIAS A MUSSI Y SUS HERMANOS EL PERSONAJE BLANCO HABÍA RECIBIDO UN PREMIO POR LOS AVANCES ALCANZADOS EN LA TERAPIA CONTRA EL CÁNCER. PERO LA VERDAD VA MÁS ALLÁ, NO ES SÓLO MUSSI, SINO MUCHOS COMO MUSSI LOS QUE OFRECEN SUS VIDAS POR UN AVANCE RIGUROSO EN LA CIENCIA Y ÉTICAMENTE REGULADO. DEBEMOS ESTAR MUY AGRADECIDOS A TODOS ELLOS. LO IMPORTANTE EN ESTA VIDA ES TENER MUY CLARO LO QUE CADA UNO QUIERE SER Y HACER LO IMPOSIBLE POR ALCANZARLO, SÓLO ASÍ UNO CONSIGUE SER FELIZ. DESDE LUEGO MUSSI LO CONSIGUIÓ. GRACIAS MUSSI.

Gracias a todos.
Los MUSSI



PATROCINADO POR LA SOCIEDAD ESPAÑOLA
PARA LAS CIENCIAS DEL ANIMAL DE LABORATORIO (SECAL) Y



VOCALÍA DE COMUNICACIÓN SECAL 2017



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



El aceite de oliva virgen contribuye a prevenir la disfunción testicular

Científicos del grupo de Neuroendocrinología y Nutrición, adscrito al Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario ceiA3 de la Universidad de Jaén, en colaboración con el Departamento de Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública de la Universidad de Cádiz, han confirmado que una alimentación rica en aceite de oliva virgen protege a las células del testículo de los daños oxidativos. Al mismo tiempo, los expertos han comparado los efectos que provoca en la fertilidad masculina el consumo de grasas saturadas frente a la dieta mediterránea.

« El aceite de oliva virgen contiene sustancias que previenen la oxidación celular, como el hidroxitirosol. Además, presenta una capacidad inmunoprotectora en los testículos, con lo que contribuye a reducir anomalías que desembocan en una deteriorada fertilidad o infertilidad masculina. »

Para estudiar la capacidad funcional del testículo asociada a la grasa vinculada a una dieta mediterránea, analizaron el túbulo seminífero (estructuras donde se forman los espermatozoides) y el epidídimo (estructura donde maduran y se almacenan los espermatozoides durante un predeterminado tiempo).

Los científicos analizaron la actividad de tres proteínas con diferentes roles: regular el sistema hormonal y controlar la presión sanguínea, supervisar la función reproductiva, y equilibrar el desarrollo del testículo, en especial su estado inmunológico.

Los resultados de este estudio se obtuvieron mediante un modelo *in vivo*, en el que se experimentó con ratas machos de la cepa Wistar durante 24 semanas. “Comenzamos con ejemplares de seis meses de edad que fueron alimentados con distintas dietas hasta el final de la experimentación, al cumplir el año de edad”, concreta Domínguez-Vías. Las ratas se dividieron en tres grupos diferentes según su alimentación. El primero recibió una dieta comercial estándar, mientras los otros dos se alimentaron con dietas calóricas. La composición energética entre los grupos 2 y 3 era la misma, únicamente diferían en la calidad o grado de saturación de la grasa añadida. Para el segundo grupo, la alimentación se suplementaba con grasa monoinsaturada proveniente del aceite de oliva virgen extra, y al tercero, se le añadía grasa saturada de la

mantequilla con colesterol añadido.

Tras los ensayos, se encontraron sendas diferencias en los dos grupos tratados con dietas ricas en grasa. “El resultado más evidente es que no se observa un incremento del peso corporal en los animales que consumieron la dieta con aceite de oliva virgen, evitando así la aparición de signos clínicos de obesidad. Por tanto, se demuestra que este tipo de grasa reduce considerablemente los niveles plasmáticos de triglicéridos y colesterol total”, asegura Domínguez-Vías. En este estudio, además de evaluar el estado funcional del testículo, se analizan las propiedades del aceite de oliva virgen extra con el fin de considerarlo un agente colaborador de la fertilidad masculina. “Todavía no podemos confirmar que tenga capacidad de mejorar la fecundidad, pero sí podemos evidenciar que mejora algunos de los parámetros testiculares que determinan un correcto funcionamiento inmunitario en el desarrollo de espermatozoos”, advierte este experto.

Una vez analizadas estas proteínas, junto con otra caracterizada por su alto contenido en grasas, los expertos observaron que actúan de forma diferente. Por un lado, obtuvieron que sólo la grasa saturada de la mantequilla era capaz de modular la protección del testículo: “De esta forma, exige una mayor defensa ante agentes externos y también la eliminación de sustancias tóxicas procedentes de la degradación oxidativa de los lípidos”, aclara Domínguez-Vías. Por el contrario, con el aceite de oliva virgen detectaron que la proteína encargada de proteger el testículo, podría favorecer el equilibrio en el proceso de formación de espermatozoides. “Esta consecuencia se debe a los efectos antioxidantes de los polifenoles del aceite de oliva cuando actúan en los testículos”, señala este investigador.

Paralelamente a este trabajo, están desarrollando otras líneas de investigación centradas en determinar qué compuestos del aceite de oliva virgen podrían utilizarse como suplementos para la mejora de la fertilidad. “El aceite de oliva, como componente principal de la dieta mediterránea, podría ser una herramienta terapéutica de cara al futuro, pero se advierte que los datos que se manejan no son todavía concluyentes y siguen siendo una incógnita los mecanismos”, augura Domínguez-Vías.

Las conclusiones de este estudio, publicado en el *International Journal of Molecular Science*, demuestran una relación directa

entre la modificación de los lípidos y la actividad de enzimas implicadas en el mantenimiento del proceso de formación de las células sexuales masculinas. El aceite de oliva posee capacidad inmunoprotectora, lo que contribuiría a reducir anomalías que provocan un deterioro de la fertilidad masculina. En este sentido, han corroborado que ciertos componentes del aceite de oliva virgen como los polifenoles, ejercen un efecto protector en el desarrollo de la función testicular.

BIBLIOGRAFÍA

- <http://www.agenciasinc.es/Noticias/Tomar-aceite-de-oliva-virgen-contribuye-a-prevenir-la-disfuncion-testicular>
- Domínguez-Vías G., Segarra A.B., Martínez-Cañamero M., *et al.* Influence of a Virgin Olive Oil versus Butter Plus Cholesterol-Enriched Diet on Testicular Enzymatic Activities in Adult Male Rats. International Journal of Molecular Science. 2017,18(8):1701. DOI: 10.3390/ijms18081701.



Fármacos basados en la melatonina para luchar contra el Parkinson

Investigadores españoles han publicado un nuevo avance sobre los mecanismos moleculares de la actividad anti-parkinsoniana de la melatonina. Los resultados indican que la neuroinflamación y el daño mitocondrial son dos procesos independientes que ocurren en la enfermedad. Precisamente, la melatonina es capaz de prevenir todos esos procesos neurodegenerativos porque su acción principal es actuar dentro de la mitocondria. El Parkinson es una enfermedad degenerativa producida por la muerte de neuronas de la sustancia negra que producen dopamina en el mesencéfalo cerebral. Cuando el nivel de este neurotransmisor disminuye, se altera la información en el circuito de los ganglios basales y esto se traduce en: temblor, rigidez, lentitud de movimientos e inestabilidad postural, entre otros síntomas.

A pesar de todos los avances en neurología, hoy en día se desconoce la causa de la patología, por lo que también cómo prevenirla. Recientemente, un equipo de científicos liderado por Darío Acuña-Castroviejo, catedrático de la Universidad de Granada (UGR), ha avanzado en los mecanismos moleculares de la actividad anti-parkinsoniana de la melatonina.

« La melatonina es capaz de prevenir todos los procesos neurodegenerativos y prevenir la muerte neuronal. »

Publicado en la revista *PlosOne*, este estudio se ha enfocado hacia el papel de las óxido nítrico sintasas, enzimas encargadas de la producción de óxido nítrico (NO), un neurotransmisor y neuromodulador que cuando se produce en exceso participa en el proceso de daño mitocondrial y neurodegenerativo. En especial, se han estudiado las formas enzimáticas inducible (iNOS) y neuronal (nNOS), ya que han sido consideradas dianas terapéuticas en esta enfermedad. Junto a sus trabajos anteriores en modelos de enfermedad de Parkinson (EP) en cultivos celulares, *Danio rerio* y ratón, el Dr. Acuña-Castroviejo apunta que *“con esta investigación cerramos uno de los aspectos más controvertidos de la fisiopatología del Parkinson e identificamos dianas moleculares altamente específicas para el diseño de nuevos fármacos con los que tratar la patología”*.

La fisiopatología de la EP presenta tres aspectos fundamentales: neuroinflamación, pérdida de dopamina y disfunción mitocondrial. Estos procesos llevan a la muerte de las neuronas dopaminérgicas y aparición de la sintomatología parkinsoniana.

“Dado el papel central de la mitocondria en la célula, hasta ahora se pensaba que el proceso inflamatorio que se produce en la EP, y que es debido al aumento de la iNOS y producción de NO en exceso, daba lugar a una entrada masiva de NO a la mitocondria, donde inducía daño oxidativo/nitrosativo, deficiencia bioenergética y disminución de la producción de ATP. Todo ello daría lugar a la muerte neuronal”, explica así el Dr. Acuña.

En este estudio, y usando tres cepas de ratones -silvestres, deficientes en nNOS y deficientes en iNOS- los científicos han podido demostrar que, al contrario de lo que se pensaba, el fallo mitocondrial que condiciona la muerte neuronal dopaminérgica durante el desarrollo de la EP es independiente de esas dos enzimas.

Por tanto, la neuroinflamación y el daño mitocondrial son dos procesos independientes que ocurren en el Parkinson. *“Mediante técnicas de respirometría de alta resolución, pudimos demostrar también que es la inhibición de la actividad del complejo I mitocondrial, el evento primario responsable del fracaso bioenergético y déficit de ATP (el combustible de la mayoría de los procesos celulares)”*, subraya el investigador.

“La secuencia de eventos que da lugar a la muerte neuronal dopaminérgica en la EP comienza por el daño mitocondrial, continúa con un proceso de daño neuronal, que sigue con la respuesta inflamatoria o neuroinflamación, y culmina en la muerte neuronal y pérdida de dopamina. A su vez, la muerte neuronal favorece el daño mitocondrial, entrando en un círculo vicioso crónico de estrés oxidativo que acelera la neurodegeneración”, añade.

Precisamente, la melatonina es capaz de prevenir todos esos procesos neurodegenerativos porque su acción principal es actuar dentro de la mitocondria, restableciendo la actividad del complejo I y la producción de ATP. Esta circunstancia neutraliza el

estrés oxidativo y la neuroinflamación secundarios a la disfunción mitocondrial, previniendo la muerte neuronal.

La melatonina ha demostrado, una vez más, su capacidad neuroprotectora y su utilidad clínica debido a la especificidad de sus acciones para mantener la integridad de la función mitocondrial.

BIBLIOGRAFÍA

- <http://www.agenciasinc.es/Noticias/Farmacos-basados-en-la-melatonina-para-luchar-contr-el-parkinson>
- López A., Ortiz F., Doerrier C., et al. *Mitochondrial impairment and melatonin protection in parkinsonian mice do not depend of inducible or neuronal nitric oxide synthases. Plos One.* 2017,12:e0183090. DOI: 10.1371/journal.pone.0183090.



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

**ANUNCIE
EN ANIMALES
DE LABORATORIO**

**LA REVISTA DE
LA SECAL**

publicidad.revista@secal.es

SECAL sociedad española
para las ciencias
del animal de laboratorio

Desarrollar mejores analgésicos para tratar el dolor articular

Investigadores de la Universidad de Granada lideran un estudio realizado en ratones con artritis, que demuestra que las neuronas que median el dolor articular son diferentes de las que median el dolor cutáneo. Profundizar en este tipo de trabajos podría dar lugar al desarrollo de analgésicos mejores.

«Las alteraciones funcionales que presentan los pacientes con artritis afectan negativamente a su calidad de vida, dificultando tareas cotidianas que a una persona sana le parecen sencillas.»

Esta disminución en la función física de los pacientes artríticos se puede cuantificar en las consultas de reumatología mediante la medición de la fuerza de agarre del miembro superior afectado. Este parámetro guarda una proporción directa tanto con la progresión de la enfermedad como con el dolor que sufre el paciente, ya que ambos están íntimamente relacionados.

El desarrollo de nuevos analgésicos requiere el uso de modelos animales que se aproximen lo máximo posible a la situación del paciente. Sin embargo, a pesar de la importancia clínica de la fuerza de agarre, rara vez se usa en investigación preclínica debido a que el paradigma experimental predominante en roedores se centra en el conocimiento que tenemos del dolor cutáneo (al recibir una estimulación sensorial en la piel).

«Los fármacos que producen analgesia en el dolor cutáneo no necesariamente lo han de producir en el dolor articular.»

El estudio llevado a cabo por científicos de la Universidad de Granada, junto con la empresa farmacéutica Esteve y el Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento, demuestra que la fuerza de agarre puede ser utilizada en ratones con artritis para la evaluación de analgésicos, y que las neuronas sensoriales que median este tipo de dolor, son diferentes de las que median el dolor cutáneo, por lo que los fármacos que producen analgesia en esto último no necesariamente lo han de producir en el dolor articular.



“Profundizar en este tipo de estudios podría dar lugar al desarrollo de analgésicos mejores, dirigidos específicamente a aliviar el dolor articular”, afirma el director de este trabajo Enrique J. Cobos del Moral, investigador del departamento de Farmacología e Instituto de Neurociencias.

BIBLIOGRAFÍA

- <http://www.agenciasinc.es/Noticias/Desarrollar-mejores-analgésicos-para-tratar-el-dolor-articular>
- Montilla-García A., Tejada M.A., Perazzoli G., et al. Grip strength in mice with joint inflammation: A rheumatology function test sensitive to pain and analgesia. *Neuropharmacology*. 2017,125:231-42. DOI: 10.1016/j.neuropharm.

aco

An **Allentown** Company

ACO Allentown es el nuevo nombre de un equipo profesional líder y con décadas de experiencia en el diseño, implantación y mantenimiento de soluciones de lavado de equipos utilizados en los centros de investigación biomédica. Sodispan Research distribuye en España todos los sistemas ACO Allentown.



Lavabiberones



Lavajaulas



Lavaracks

Jordi Sabater Pi: Etólogo y primatólogo

Aprovecho la nota de prensa emitida por Proyecto Gran Simio para presentar y resumir la figura del Prof. Jordi Sabater Pi, etólogo y primatólogo, y recobrar algunas de sus opiniones respecto al trato que dispensamos a los grandes simios.

Jesús Martínez Palacio

Coincidiendo con el aniversario de su muerte, la Organización Proyecto Gran Simio ha concedido al etólogo y primatólogo Jordi Sabater Pi (a título póstumo) el diploma "Defensor de la Igualdad", por su trayectoria en la defensa de los primates y en especial de los grandes simios.

La gran trayectoria de Jordi fue casi ocultada por la popularidad de Copito de Nieve. En 1966, la anécdota como él la calificó de encontrar a Copito de Nieve y trasladarlo al zoológico barcelonés, unió su nombre al de este gorila albino para siempre. Unos cazadores lo encontraron abrazado al vientre de su madre muerta, y él le salvó la vida. No hubiera sobrevivido solo en la selva; no sólo por la falta de sus padres, sino por las deficiencias que implica el albinismo (de oído, vista, piel, etc.), así como por resultar altamente visible y, por lo tanto, muy vulnerable.

El mundo académico conocía bien a este catedrático de psicobiología y etología: Dr. Honoris Causa por la Universidad Autónoma de Barcelona y por la Universidad Autónoma de Madrid, y premio Narcís Monturiol a las ciencias (mayo 2005). A él se debe la introducción de la etología en nuestro país, y la creación de la primera cátedra de esta especialidad en la Universidad de Barcelona.

Entre 1940 y 1969, estudió las culturas autóctonas y las especies locales de Guinea Ecuatorial. Becado por *National Geographic*, conoció a Diane Fossey, quien en 1972 le invitó a realizar un estudio conjunto, con un trabajo firmado por los dos en el *Journal Zoologic Society* sobre el estudio de los gorilas de montaña. En 1976 fue profesor de etología, incluyendo de esta forma la asignatura por primera vez en la Universidad de Barcelona y en España, el estudio del comportamiento animal y de la primatología. Fue el primero en observar que los chimpancés fabricaban palos para coger termitas e ingerir cierto tipo de arena de cualidades medicinales.

En uno de sus libros, "El chimpancé y los orígenes de la cultura", nos decía: *"Ahora sabemos que su esquema psicológico (el de los grandes simios) se asienta sobre unas capacidades que, hasta hace muy poco, las considerábamos exclusivas del hombre. Todo esto merece una profunda reflexión, una reconsideración objetiva de unos valores que siempre se habían considerado inamovibles y, cómo no, debemos aceptarlo como una lección de humildad. Como colofón me atrevería a decir al lector que todos los animales, pero muy especialmente los grandes simios, merecen un serio y consciente respeto. No deberían tolerarse las exhibiciones grotescas de estos animales disfrazados de humanos, ni su explotación comercial sea la que fuere, ni su uso para el trasplante de vísceras o empleo en laboratorios de experimentación clínica, y hasta sería necesario reconsiderar la conveniencia de exhibirlos en los zoológicos. No dudo que dentro de algunos años seremos juzgados muy severamente por esta conducta que es posible se pretenda parangonar, en cierta manera, con la dispensada hace menos de 200 años, por los blancos a sus hermanos negros que, como esclavos, vendían, como si de animales se tratara a los plantadores americanos"*.

Jordi Sabater Pi falleció en Barcelona el 5 de agosto de 2009.

BIBLIOGRAFÍA

- <http://www.addarevista.org/article/personajes/33/jordi-sabater-pi-pionero-e-introductor-de-la-etologia-en-espana-flora-aguilera/>
- <http://proyectogransimio.org/noticias/ultimas-noticias/proyecto-gran-simio-en-el-aniversario-de-la-muerte-del-mas-prestigioso-primatologo-de-espana-jordi-sabater-pi-le-concede-a-titulo-postumo-el-premio-diploma-201cdefensor-de-la-igualdad201d>

ANÁLISIS DE AGUAS

Pídelo, que nosotros
nos encargamos de todo.



Realiza la solicitud
por teléfono, email o
en nuestra web.



En 24h recibirás un kit
con instrucciones con el
que enviarnos tus
muestras sin coste.



Las recogemos,
las analizamos y
tendrás los resultados
en tu correo.

fácil, rápido, fiable

PRIMER ANÁLISIS GRATUITO*

T 948 40 26 28 / info@vuler.es / www.vuler.es

*Consulta condiciones en nuestra web.

Caídas: Soluciones inspiradas en la naturaleza para un riesgo habitual en los animalarios

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

Recogemos hoy una información publicada en El Correo y la aprovechamos para revisar este problema. Un estudio del Centro Tecnológico del Calzado de La Rioja (CTCR) busca diseñar un material antideslizante que prevenga los resbalones, tropiezos y caídas, relacionados con el 15% de los accidentes laborales ocurridos en animalarios.

Las caídas son un problema relevante en el sector de la experimentación animal. En esta misma sección ya las hemos tratado desde distintos puntos de vista (calzado, escaleras...); y en esta ocasión, vamos a ver cómo la ciencia se fija en la naturaleza para encontrar soluciones a problemas comunes.

muchísimos filamentos muy finos (setas, unos 5.000 por mm^2), y cada seta se divide en 400-1.000 ramas que terminan en una estructura en forma de espátula de 200 a 500 nanómetros de largo. De este modo, cuando un geco pone su "pie" en una pared u otra superficie y enrosca sus dedos, sus espátulas nanométricas pueden llegar tan cerca de los rincones y grietas, que sus átomos interactúan con los átomos de la pared.

La interacción entre los dedos y la superficie podría relacionarse con las fuerzas de Van der Waals.

Si sus dedos fuesen pegajosos como una cinta adhesiva o dependiesen de una fuerte succión, sería difícil para un geco caminar o correr, ya que sería demasiado difícil separar sus pies de la superficie. Las fuerzas entre los átomos del pie del geco y los átomos de la pared, son fuerzas relativamente débiles, las llamadas fuerzas de Van der Waals. El área de contacto entre el pie y la superficie debe ser lo suficientemente grande para que estas fuerzas tan débiles individualmente puedan convertirse en una fuerza mucho más fuerte, lo suficientemente fuerte como para sostener a este animal.

Esta extraordinaria propiedad ha hecho del geco objeto de estudio durante innumerables años en la síntesis de adhesivos que imitan su biomecánica, y es la que ha servido para la puesta en marcha de un nuevo proyecto que el CTCR está llevando a cabo junto a la empresa de calzados Mendi, dedicada desde 1953 a la fabricación nacional de calzado de seguridad para cada sector profesional.

El estudio en sí consiste en el diseño de un material antideslizante para zapatos/botas de seguridad. Para ello, los nanotecnólogos están analizando previamente la aplicación del



Imagen tomada de Pixabay. Imagen suministrada por la autora

Figura 1.- Imagen de un geco.

Investigadores del CTCR se han fijado en el geco (ver Figura 1), reptil capaz de subir superficies verticales sin utilizar pegamento ni adhesivos químicos ni ningún tipo de succión: le bastan sus patas filamentosas. Los dedos de sus pies están formados por

concepto de "anti-resbalamiento" que emplea este reptil, y su viabilidad para el desarrollo de suelas que imiten la geometría y el funcionamiento de los pies del geco.

Dentro del calzado, la suela juega un papel fundamental, ya que es la encargada de absorber el impacto de la pisada, aislar térmicamente al pie, proteger de las irregularidades del terreno y, por supuesto, evitar resbalones. Estos, junto a los tropiezos y caídas, son la mayor causa de accidentes en todos los sectores económicos en la Unión Europea desde la industria pesada hasta el trabajo de oficina. Con ellos está relacionado el 24% de todos los accidentes laborales. En nuestro sector (experimentación animal), ciframos el porcentaje de accidentes por esta causa entre el 6-15%.

Por el momento, según informan desde el CTCR, el trabajo que están desarrollando en materia de investigación ha proporcionado buenos resultados en la mejora de los coeficientes de fricción en suelas (CoF) y la creación de patrones mixtos con subestructuras tanto macro como micrométricas. Esto último da lugar a aumentos en el CoF, lo que implica la reducción de accidentes por resbalones, y minimiza a su vez los daños personales y económicos que año tras año se siguen produciendo en este ámbito.

En 2012, un equipo de científicos de la Universidad de Massachusetts Amherst inventó inspirado en las patas del geco un dispositivo llamado *Geckskin*, que permite pegar y despegar fácilmente un objeto de más de 300 kg en una pared lisa. El descubrimiento apareció publicado en la revista *Advanced Materials*.

BIBLIOGRAFÍA

- <http://www.elcorreo.com/alava/sociedad/salud/investigacion/201707/04/suelas-antideslizantes-inspiradas-20170704194314-ntrc-rc.html>
- Bartlett M.D., Croll A.B., King D.R., et al. *Looking Beyond Fibrillar Features to Scale Gecko-Like Adhesion*. *Advanced Materials*. 2012, 24:1078-83.
- <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adma.201104191/full>

HÁGASE SOCIO BENEFACTOR
SU EMPRESA TAMBIÉN PUEDE SER PARTE DE LA SECAL

ESTAMOS
EN EL CENTRO DE
LA INVESTIGACIÓN
EN HABLA
HISPANA

Dolor y Enterotoxemia

José Luis Martín Barrasa^{1,2}, Francisco J. Chamizo Lopez³, M^a Xosé Fernández Maciá¹, Ana Bordes Benítez³

1. Servicio de Experimentación Animal. Unidad de Investigación. Hospital Universitario de Gran Canaria, Dr. Negrín. Las Palmas de Gran Canaria. España.

2. Enfermedades Infecciosas e Ictiopatología. Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Arucas. España.

3. Servicio de Microbiología. Hospital Universitario de Gran Canaria, Dr. Negrín. Las Palmas de Gran Canaria. España.

Conejo New Zeland, macho de 3,5 años y 3700 g de peso. Estabulado individualmente en rack con dimensiones homologadas según RD 53/2013, paredes transparentes que permiten contacto visual con otros individuos, piso perforado de plástico bajo el que se encuentra una bandeja extraíble con viruta para recoger orina y heces sin contacto con los animales, con 1 comedero de acero inoxidable y biberón externo de plástico, con tetina de acero inoxidable. Alimentación en forma de pellets para conejos de granja, Capisa®, administrado *ad libitum*. Agua: red de abasto, hiperclorada 3ppm. Para la cama se utiliza viruta de madera de haya y se coloca en las bandejas sanitizadas de las jaulas, como cama, pero sin contacto.

- Pertenece a un lote de animales a los que se les ha practicado una nueva técnica, en estudio, de iridectomía. Tras una semana post intervención, observamos una disminución del apetito sin causa aparente a lo largo de los últimos 5 días. La medicación recibida hasta el momento, que el investigador prescribía para los animales intervenidos quirúrgicamente, consistía en Ampicilina: 8 mg/kg/24h vo x 10 días, comenzando 2 días previos a la iridectomía.
- Eritromicina: 2 g/L agua de bebida x 10 días, comenzando 2 días previos a la iridectomía.

En el examen físico observamos (ver Figura 1): secreción conjuntival en el ojo intervenido, signos leves de deshidratación, abundante caída de pelo y tensión en pared abdominal con dolor a la palpación. Un examen detallado de la superficie de apoyo de la jaula, revela la presencia de diarrea mucosa moderada.



Imagen suministrada por la autoría

Figura 1.- Diarrea y anorexia en New Zeland, macho, 3,5 años y 3700 g de peso intervenido de iridectomía hace 7 días. Exudado conjuntival, dolor abdominal y deshidratación moderada.

Se realizó ecografía de abdomen, siendo el hallazgo principal la existencia de acúmulo gaseoso intenso, que ocupaba el ciego. Simultáneamente, se realizó coprocultivo en aerobiosis, para detección de enteropatógenos y técnica de flotación de heces para protozoos y helmintos. Se evidenció ausencia de parásitos y de bacterias Gram negativas y, por el contrario, presencia de cocos Gram positivos, catalasa positivos, coagulasa negativos y abundantes levaduras (ver Figura 2). Por último, se realizó cultivo microbiológico del exudado conjuntival, aislándose una cepa de *Staphylococcus aureus*, sensible a gentamicina y enrofloxacin.

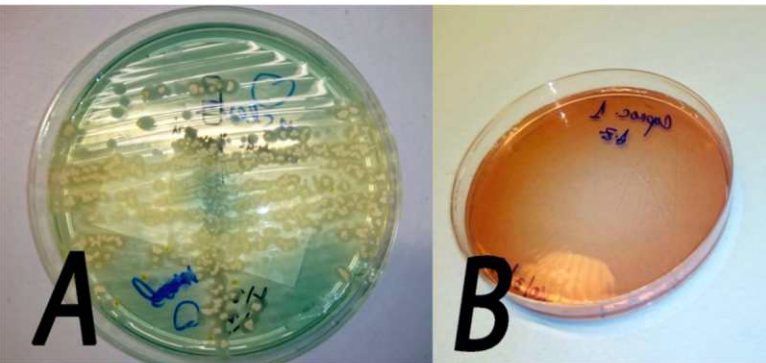


Imagen suministrada por la autora

Figura 2.- Resultado de coprocultivo: **A:** Placa de Petri con medio CLED con colonias blanquecinas y color crema, correspondientes a cocos Gram (+) y levaduras (*Candida spp.*). **B:** Placa de Petri con medio MacConkey agar, con ausencia de crecimiento.

El diagnóstico presuntivo fue disbiosis intestinal con fermentación cecal por hipomotilidad gastrointestinal (HGI) relacionada con una dieta aberrante.

¿Y tú qué opinas?

¿Estás de acuerdo con el diagnóstico?

¿Qué otras pruebas diagnósticas propondrías para asegurar el diagnóstico?

¿Qué tratamiento aconsejarías?

¿Qué técnicas de manejo nos propones como preventivas ante situaciones futuras?

SOLUCIÓN

La HGI es un cuadro clínico que acompaña a numerosas patologías, normalmente asociadas a situaciones de estrés, dolor o anorexia de cualquier etiología. En nuestro caso concreto, concurren varias circunstancias que, en nuestra opinión, desencadenan este cuadro.

Por un lado, observamos una dieta basada exclusivamente en granulado para conejos de granja, que normalmente presenta un alto contenido proteico y bajo aporte de fibra. Este tipo de dieta ha sido referida por algunos autores como causa desencadenante de HGI en conejos (Fox *et al.*, 2002; Brotens *et al.*, 2004). Una corrección en la dieta con un aporte de heno, alfalfa en rama, hierba fresca y verduras estimula la motilidad gastrointestinal y

previene el desarrollo de lipidosis hepática, muchas veces con resultado fatal para el animal. Por otro lado, el olor del heno parece estimular el apetito y además sirve para dar una sensación de seguridad, disminuyendo el estrés del animal.

Centrándonos ahora en el tratamiento antibiótico que ha recibido el animal, debemos tener en cuenta que tanto la Ampicilina como la Eritromicina presentan serios efectos adversos sobre la funcionalidad intestinal en conejos. Las diarreas y enteritis, en algunos casos fatales, han sido relacionadas directamente con la administración oral de estos dos antimicrobianos. El tratamiento oral con dosis superiores a los 5 mg/kg de Ampicilina o a 3 g/L de Eritromicina en el agua de bebida, está desaconsejado por algunos autores por su toxicidad (Morris *et al.*, 1995). Ésta podría ser la causa de la clara disbiosis intestinal que, a la vista de los resultados del coprocultivo, nuestro animal presentaba. La ausencia de *Enterobacteriaceae* y la proliferación de levaduras así lo evidencian. Por otro lado, la proliferación de clostridios en conejos adultos, ha sido relacionada con factores como el dolor, estrés, la disbiosis intestinal y/o la administración de antibióticos (Fox *et al.*, 2002). El diagnóstico presuntivo de la enterotoxemia de los conejos, causada por cepas productoras de toxina loto de *Clostridium spiroforme*, se basa en la demostración de la bacteria en el intestino del animal afectado. La visualización de bacterias Gram positivas de forma circular o espiral en una impronta del contenido cecal es la técnica de rutina. Sin embargo, el diagnóstico definitivo de este cuadro comprende el aislamiento y la identificación de la bacteria y su toxina. Así, para el aislamiento de *Clostridium spiroforme* se ha recomendado centrifugar el contenido cecal, o las heces, a 20.000 g, 15 min, 4°C, y cultivar en anaerobiosis estricta la interfase entre el sobrenadante y el pellet.

Como hemos indicado, para el control de la enterotoxemia debemos centrarnos en prevenir los factores desencadenantes. El aporte de fibra, el control del dolor y, sobre todo, un uso racional de los antibióticos, es fundamental. En ese sentido, la administración tópica o parenteral de los mismos es preferible a la vía oral. La gentamicina o la enrofloxacin podrían ayudarnos como tratamiento profiláctico tras la intervención en el iris, y además a tratar la infección local del ojo afecto. No debemos confundirnos con la administración de estos antibióticos, u otros, para el tratamiento frente a *C. spiroforme*. No existe evidencia de la efectividad de los mismos para esta patología concreta en conejos. Por el contrario, sí que se recomienda un buen aporte de fluidos y el empleo de colestiramina, una resina intercambiadora de iones que actúa bloqueando a la toxina de esta bacteria (Lipman *et al.*, 1992).

¿Y TÚ QUÉ OPINAS?

La reposición de la flora bacteriana no debe llevarse a cabo con fermentos lácticos como *Lactobacillus spp.*, ya que estos gérmenes no son componentes habituales de la flora gastrointestinal en conejos. Una buena alternativa es la administración de cecotrofos de conejos sanos, mezclados en la dieta.

Por último, debemos profundizar un poco más en el factor dolor. No observamos tratamiento analgésico post iridectomía, y ya hemos hablado de su papel determinante en los cuadros de HGI (Brotóns *et al.*, 2004). Debe recordarse que el dolor acentúa aún más la HGI, así cuando exista dolor (relacionado o no con el tracto gastrointestinal) tenemos que emplear analgésicos. Es por ello que el empleo de éstos nunca debió pasar inadvertido. Dependiendo de los objetivos del estudio, podríamos usar una gran variedad de fármacos: desde los opiáceos clásicos (buprenorfina 0,02-0,1 mg/kg/8-12 h *sc o im*) hasta los AINEs como el carprofeno (1,5 mg/kg/12h *po*) o el tepoxalin (10 mg/kg/24h *po*) que han dado excelentes resultados.

Como complemento al tratamiento propuesto, podemos emplear metoclopramida (0,5 mg/kg/8h *vo*) y clanobutina (10 mg/kg/12h *sc*) como estimulantes de la motilidad y de las secreciones gastrointestinales respectivamente. Si los animales llevaran más de 24 h sin comer, la ranitidina (2 mg/kg/24 h *iv*) sería útil para evitar la formación de úlceras gástricas que podrían llegar a perforar la pared del estómago y desencadenar peritonitis.

BIBLIOGRAFÍA

- Brotóns N.J. y Blasco M. *Hipomotilidad gastrointestinal en conejos: 7 casos clínicos*. AVEPA. 2001, 24(4):211-9.
- Fox J.G., Anderson L.C., Loew F.M., *et al.* *Laboratory Animal Medicine (American College of Laboratory Animal Medicine)*. Academic Press, 2nd Edition jun 2002. Chap 9. Pág. 342.
- Lipman N.S., Weischedel A.K., Connors M.J., *et al.* *Utilization of cholestyramine resin as a preventive treatment for antibiotic (clindamycin) induced enterotoxaemia in the rabbit*. Lab Anim. 1992, 26(1):1-8.
- Morris T.H. *Antibiotic therapeutics in laboratory animals*. Lab Anim. 1995, 29(1):16-36.

Congress

ESLAV - ECLAM AAALAC - SECAL Conference 2018

Improving quality and translation
of experimental animal studies

15 - 16 October 2018,
Barcelona Spain



eclam

European College of
Laboratory Animal Medicine





Detail Report View The Vivarium Plus

Blower Address: 180.168.13.13 Name: BL-A.13.13 Report Date: 09/15/2014

	Supply	Exhaust	Alarm
Date Created	ACH	Temp	Humidity
09/15/2014 00:00:49...	53	78 F	44 %
	Supply	Exhaust	Alarm
Date Created	ACH	Temp	Humidity
09/15/2014 00:01:47...	53	78 F	44 %
	Supply	Exhaust	Alarm
Date Created	ACH	Temp	Humidity
09/15/2014 00:02:45...	53	78 F	44 %
	Supply	Exhaust	Alarm
Date Created	ACH	Temp	Humidity
09/15/2014 00:03:43...	53	78 F	44 %
	Supply	Exhaust	Alarm
Date Created	ACH	Temp	Humidity
09/15/2014 00:04:42...	53	78 F	44 %
	Supply	Exhaust	Alarm
Date Created	ACH	Temp	Humidity
09/15/2014 00:05:39...	53	78 F	44 %
	Supply	Exhaust	Alarm
Date Created	ACH	Temp	Humidity
09/15/2014 00:06:38...	53	78 F	44 %
	Supply	Exhaust	Alarm
Date Created	ACH	Temp	Humidity
09/15/2014 00:07:36...	53	78 F	44 %
	Supply	Exhaust	Alarm
Date Created	ACH	Temp	Humidity
09/15/2014 00:08:35...	53	78 F	44 %
	Supply	Exhaust	Alarm
Date Created	ACH	Temp	Humidity
09/15/2014 00:09:31...	53	78 F	44 %
	Supply	Exhaust	Alarm
Date Created	ACH	Temp	Humidity
09/15/2014 00:10:29...	53	78 F	44 %
	Supply	Exhaust	Alarm

Sodispan Research ha incorporado a su portfolio de representadas a la compañía americana Allentown. La fiabilidad, el rendimiento, la calidad, el valor, la experiencia en la fabricación y el esmerado servicio al cliente, hacen de Allentown la mejor alternativa en soluciones de alojamiento de los animales utilizados en la investigación biomédica.

Enriquecimiento ambiental en ratones de laboratorio

Ivan Ortega Sáez¹, Garikoitz Azkona¹ y Silvia Cufí²

1. PCB-PRBB Animal Facility Alliance, Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB).

2. Departament de Recerca i Innovació, Fundació Clinic per la Recerca Biomèdica (FCRB).

INTRODUCCIÓN

Las condiciones de alojamiento de los animales de laboratorio juegan un papel importante en su bienestar. Sin embargo, en muchas ocasiones, el diseño de los sistemas de alojamiento se ha basado más en aspectos económicos y ergonómicos (Baumans, 2005), que en las necesidades de la especie a alojar. Con el fin de mejorar las condiciones de vida e incrementar las oportunidades para que los animales realicen el repertorio de comportamiento específico de su especie, se han diseñado diferentes programas de enriquecimiento ambiental.

El enriquecimiento ambiental son todas aquellas modificaciones del ambiente en el que viven los animales en cautividad, que se establecen con el fin de mejorar su bienestar físico y psicológico mediante estímulos adaptados a sus necesidades específicas (Newberry, 1995).

Donald Hebb (1947) fue el primero en comprobar los beneficios del enriquecimiento ambiental. El Dr. Hebb describió que ratas alojadas en condiciones estándar de laboratorio (4-5 ratas por cubetas y sin objetos) mostraban una peor capacidad cognitiva que las ratas que tenía como mascotas alojadas libremente en su casa. Desde entonces, se han realizado numerosos estudios que demuestran los efectos beneficiosos de la estimulación ambiental.

La legislación actual –mediante el RD53/2013, Anexo II, 3.3 b) Enriquecimiento ambiental– establece que: *“Todos los animales deben disponer de un espacio de la complejidad suficiente para permitirles expresar una amplia gama de comportamientos normales. Deben contar con cierto grado de control y elección de su entorno, para reducir los comportamientos inducidos por el estrés. Los establecimientos deben contar con técnicas de enriquecimiento adecuadas que amplíen la gama de actividades al alcance del animal y desarrollen su capacidad de adaptación, como el ejercicio*

físico, la búsqueda de comida y las actividades de manipulación y exploración en función de la especie. El enriquecimiento ambiental del recinto de animales debe adaptarse a las necesidades individuales y a las propias de la especie. Las estrategias de enriquecimiento de los establecimientos deben revisarse y actualizarse con regularidad”. Tal y como se indica, sería importante establecer los **programas de enriquecimiento ambiental** en función de la especie y analizarlos en términos del beneficio para el animal, evaluando su uso y preferencia, así como su efecto sobre el comportamiento y los parámetros fisiológicos. Del mismo modo, sería necesario evaluar también el impacto de dicho enriquecimiento sobre los resultados científicos (Baumans, 2005).

ETOGRAMA

El primer paso para diseñar un programa de enriquecimiento ambiental es conocer el repertorio de conductas propias de la especie o etograma.

Todas las especies animales se caracterizan por tener una serie de necesidades etológicas o conductuales que deben poder expresar normalmente. Estas necesidades las podemos clasificar en:

- Comportamiento social

La mayor parte de las especies animales de laboratorio son sociales, por lo que deben alojarse en grupo, en un número adecuado de individuos, evitando reintroducciones de nuevos animales en la medida de lo posible, para que puedan formarse grupos estables. El alojamiento individual debe evitarse en la medida de lo posible. Excepcionalmente, se podrán individualizar cuando se den casos de agresividad severa y/o cuando el procedimiento experimental lo requiera, previa aprobación por el comité ético.

- Refugio

Los animales de laboratorio son mayoritariamente presas en estado salvaje, por lo que presentan de forma innata conductas de escape y defensa. Estas respuestas innatas se pueden minimizar si disponen de refugios. Los roedores, además, presentan tigmotaxia o tendencia natural a situarse junto a las paredes o superficies rugosas, mientras que rehúsan los espacios abiertos.

- Ejercicio y exploración

El tamaño reducido de los recintos donde se alojan los animales dificulta el ejercicio físico. De este modo, hay que ofrecerles estructuras que les ayuden a fomentar la actividad. Hay que tener en cuenta que es necesario revisar y rotar de manera

periódica los elementos de bienestar animal introducidos, para favorecer la novedad y la exploración.

- Búsqueda o captura del alimento

Los animales en libertad suelen dedicar un elevado porcentaje de su tiempo a la búsqueda o captura del alimento, este comportamiento se suprime cuando se encuentran en cautividad. Es por ello que se aconseja dificultar el acceso a la comida, escondiéndola, para mantener activa esta conducta.

En el caso concreto del ratón de laboratorio podemos encontrar todo lo relacionado con su etograma en la siguiente página web de la Universidad de Stanford: <https://web.santford.edu/group/compmed/cgi-bin/index.php> (ver Tabla 1).

Tabla 1.- Esquema del etograma de ratón, en el que se muestran las conductas propias de la especie.

ETOGRAMA			
ACTIVIDADES	GENERALES	Comportamiento exploratorio	Buscar, vigilar, explorar, aproximarse, investigar
		Interacciones de afiliación	
		Interacciones combativas	Comportamiento amenazante, comportamiento agresivo, comportamiento de huida y sumisión, comportamiento defensivo
		Comportamiento sexual	
		Comportamiento maternal	
		Comportamientos anormales	
	MANTENIMIENTO	Beber, comer, asearse, creación de nido	
INACTIVIDAD	DORMIR, VIGILIA		

DIFERENTES TIPOS DE ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL

Existen diferentes soluciones de enriquecimiento según las necesidades conductuales (ver Tabla 2):

- Comportamiento social

En ocasiones, y por necesidad de los estudios, los animales se tienen que alojar individualizados. Podemos reducir el estrés asociado reintroduciendo los animales al grupo cuando ya no sea necesario el aislamiento (siempre que sea posible), manipulándolos diariamente o añadiendo más elementos de enriquecimiento ambiental (casitas, rollos de cartón, etc.).

- Refugio

Debemos facilitar recursos diseñados en función de la especie para que los animales puedan esconderse. Estos recursos van

desde material para hacer nido hasta casitas.

- Ejercicio y exploración

Las jaulas donde se encuentran estabulados los animales deben ser de unas dimensiones que les permita realizar ejercicio (explorar el entorno). Se pueden añadir estructuras que les inciten a estar activos como plataformas, ruedas, estructuras para escalar, etc. Con el fin de aumentar la exploración, es aconsejable ir rotando los elementos, para que no pierdan novedad.

- Búsqueda o captura del alimento

Es otra forma de exploración y se puede conseguir escondiendo la comida entre la viruta o lugares de difícil acceso, o presentándola de forma que les lleve más tiempo alimentarse.

Tabla 2.- Los diferentes tipos de enriquecimiento.

SOCIAL	Con Contacto	Parejas o grupos
	Sin Contacto	Estímulos visuales, auditivos, olfativos
FÍSICO	Alojamiento	Espacio mayor al mínimo requerido
	Sensorial	Estímulos visuales, auditivos, olfativos y táctiles
	Nutricional	Basados en la dieta

Los elementos empleados para añadir enriquecimiento ambiental serán diferentes según la especie con la que estemos tratando. En el caso de trabajar con ratones pueden estar en contacto directo con los animales (casas de cartón/polisulfona, tubos de cartón, papel de baño, rollos de algodón, tubos de PVC, etc.); pueden ser estímulos olfativos a base de esencias o incluso auditivos mediante música tranquila por debajo de los 80 dB. Se pueden encontrar diferentes tipos de enriquecimiento en la página web: <http://www.enriquecimiento.net>.

PROGRAMAS DE ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL

Un programa de enriquecimiento ambiental debe mejorar el bienestar del animal, sin afectar negativamente a los resultados experimentales ni suponer una carga extra para el personal que trabaja con los animales, además de ser viable económicamente.

Un modelo utilizado en animales mantenidos en cautividad y que puede extrapolarse a los animales de laboratorio es el método S.P.I.D.E.R: <http://www.animalenrichment.org/spider/> (ver Figura 1).

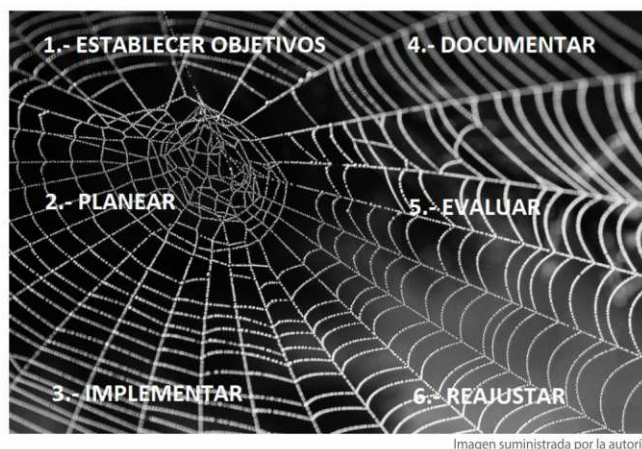


Figura 1.- Representación gráfica de los pasos del método S.P.I.D.E.R.

Este método consiste en 6 pasos:

1) Establecer objetivos (S-Setting goals)

El establecimiento de los objetivos a alcanzar empieza en el momento en que un animal llega a nuestras instalaciones. Para poder establecerlos debemos conocer el historial del animal, así como los comportamientos que queremos resaltar o minimizar mediante nuestro programa de enriquecimiento.

2) Planear (P-Planning)

Implica la creación de un programa de enriquecimiento para lograr los objetivos deseados. El enriquecimiento debe permitir a los animales escoger y tener el control dentro de su ambiente.

El desarrollar un plan conlleva varias decisiones como:

- ¿Qué comportamientos se deben de acentuar?
- ¿Qué fuentes son necesarias para nuestro programa?
- ¿Dónde se llevará a cabo el enriquecimiento?
- ¿Hay algún problema de seguridad?

3) Implementar (I-Implementation)

Hace referencia a la ejecución del programa de enriquecimiento. Programar los diferentes pasos de nuestro programa en un calendario puede permitir una mejor planificación y garantizar que los elementos estén disponibles.

4) Documentar (D-Documentation)

La documentación se puede conseguir de varias maneras. Se pueden tener registros escritos, videos, fotos o programas de seguimiento informáticos. Todos estos datos proporcionan una valiosa información para examinar las tendencias y evaluar las estrategias de enriquecimiento.

5) Evaluar (E-Evaluation)

La evaluación se puede llevar a cabo de distintas maneras, pero es necesario saber que es un punto fundamental, aunque en ocasiones se pase por alto. La valoración de tendencias y pautas es de gran ayuda para el personal que se encarga del cuidado de los animales, para tomar decisiones sobre si continuar con una estrategia particular, hacer ajustes o abortar iniciativas de enriquecimiento adoptadas. Hay que tener en cuenta que una iniciativa puede ser utilizada por los animales de manera diferente a la planeada, hecho que no tiene porqué ser negativo.

6) Reajustar (Re-Adjustment)

El reajuste del programa ocurre durante todo el proceso, aunque los ajustes de los programas de enriquecimiento suelen ocurrir regularmente antes de proporcionar el enriquecimiento, después de la evaluación de la documentación, e incluso en el proceso de fijación de objetivos.

AGRESIVIDAD ENTRE MACHOS: ¿BENEFICIOSA O MAL ADAPTATIVA?

En su hábitat natural, los ratones dominantes macho viven en grupos sociales con hembras con su progenie y machos subordinados. El dominante defiende su territorio y sus recursos, las hembras, la comida y su nido. Los machos subordinados familiares son generalmente tolerados dentro de los límites territoriales (Crowcroft, 1966; Mackintosh, 1970,1973; Hurst *et al.*, 1993). La agresión entre los machos de un grupo socialmente estable puede ser parte de una estrategia de comportamiento más amplia, en la que todas las conductas de un animal están dirigidas a alcanzar un mismo objetivo (Benus *et al.*, 1990a,b, 1991; Sluyter *et al.*, 1995). En la naturaleza, los ratones muestran números de población rítmicos. Una población puede alcanzar un nivel óptimo de congéneres, que posteriormente puede decrecer, aumentando posteriormente, y así sucesivamente. Parece que cuando los ratones viven en pequeños grupos es beneficioso poseer un carácter robusto, lo que implica ser agresivo y poco flexible, para aumentar las posibilidades de supervivencia. Cuando el tamaño de la población aumenta, sin embargo, es beneficioso tener un carácter más flexible. En el medio silvestre, los ratones más flexibles migran a otros territorios y tienen más éxito en la construcción y el mantenimiento de un nuevo territorio (Busser *et al.*, 1974).

Aunque potencialmente perjudicial, la agresión puede ser considerada como un efecto beneficioso a corto plazo. En tales situaciones, diversos mecanismos fisiológicos y de comportamiento evitan que la agresión se intensifique a niveles que son realmente perjudiciales. En el laboratorio, cuando los ratones machos están alojados en grupo, un cierto grado de agresividad puede ser considerado como normal o natural. Sin embargo, en ocasiones este grado puede ser tan alto que afecta al bienestar animal (Van Oortmerssen, 1971; Bisazza, 1981; Brain & Parmigiani, 1990).

Son varios los factores importantes que contribuyen al aumento de la agresividad en los ratones de laboratorio:

- Fondo genético

Para lograr la estandarización genética, líneas consanguíneas,

se han seguido programas de reproducción selectiva e intensiva, focalizándose en obtener ciertos rasgos morfológicos, fisiológicos o de comportamiento. Durante el proceso de consanguinidad, varias cepas de ratón se han vuelto muy agresivas, ya sea como efecto secundario de la cría selectiva o porque el comportamiento agresivo fue el criterio de selección principal (Bisazza, 1982; Mondrago *et al.*, 1987; Guillot & Chapouthier, 1998; Parmigiani *et al.*, 1999). Las señales de olor, que son importantes para el reconocimiento e identificación del estatus social, parecen ser similares entre familias dentro de cepas consanguíneas, lo que puede obstaculizar el reconocimiento individual (Nevison *et al.*, 2000). De esta manera, la conducta social puede verse alterada aumentando la agresividad.

- Comportamiento social perturbado inducido por el ambiente

Los ratones de laboratorio, debido a que viven en una zona acotada y delimitada, pueden presentar alterado su comportamiento social. Los ratones subordinados no pueden huir de los ratones dominantes, ya que no pueden salir del territorio. Esto conlleva que se frustre lo que sería una respuesta conductual apropiada, que aumente la agresividad y el sufrimiento en el ratón subordinado, que el macho dominante pueda responder de forma más agresiva, lo que puede llevar a la muerte del subordinado.

- Falta de control y de previsibilidad

Como se ha mencionado anteriormente, el alojamiento dentro de un animalario puede frustrar muchas conductas naturales. La falta de previsibilidad también puede llevar a este extremo. La continua visita de personas a las salas puede generar estrés y un aumento de la agresividad redirigida (Broom & Johnson, 1993). Por otra parte, los procedimientos experimentales o de cría fuera de rutina, a los que los ratones no pueden anticiparse, pueden aumentar las agresiones (Broom & Johnson, 1993). Otro factor a tener en cuenta es la limpieza, ya que la suciedad de las cubetas también puede aumentar la agresividad entre los individuos (Gray & Hurst, 1995). No podemos olvidar que la agresividad severa afecta el bienestar psicológico y fisiológico de las víctimas (National Research Council, 1992), y que puede interferir con los resultados experimentales.

RECOMENDACIONES PARA EL MANEJO DE RATONES MACHO EN UN ANIMALARIO

Sobre la base de la información presentada en esta revisión, se pueden formular las siguientes recomendaciones:

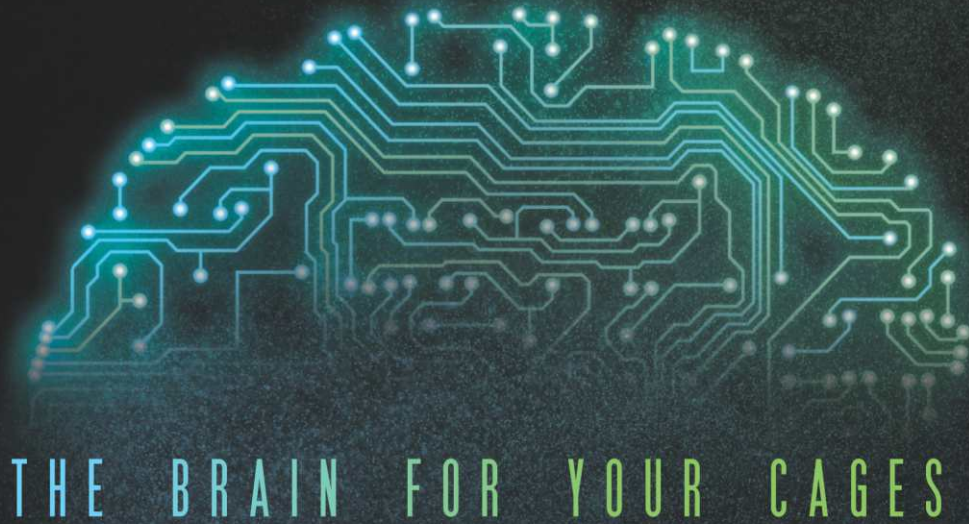
Bienestar animal

- La individualización de los ratones debe evitarse siempre que sea posible.
- En cuanto al enriquecimiento ambiental, proporcionar siempre material para hacer nido. Cuando se introduce por primera vez, disminuye la agresión entre machos y, a largo plazo, puede ayudar a los animales a superar situaciones estresantes.
- El nido debe ser transferido de una cubeta a otra, cuando se haga el cambio, ya que reduce la ansiedad y la agresividad.
- Alojamiento de machos en grupos de tres. Los tamaños de grupo más grandes pueden disminuir la posibilidad de que se desarrolle una jerarquía estable, mientras que la vivienda de parejas puede aumentar la agresión, y la falta de comodidad social puede inducir síntomas de depresión en el subordinado.
- Las perturbaciones durante un experimento deben limitarse en la medida de lo posible, ya que pueden crear situaciones en las que se produzca una agresión excesiva. Es necesario investigar más a fondo si la frecuencia, la duración, el tipo y la gravedad de las perturbaciones influyen en el desarrollo de una agresión excesiva.

BIBLIOGRAFÍA

- Baumans V. *Environmental enrichment for laboratory rodents and rabbits: requirements of rodents, rabbits, and research*. ILARJ. 2005, 46(2):162-70.
- Benus R.F., Bohus B., Koolhaas J.M., et al. *Behavioural strategies of aggressive and non-aggressive male mice in response to inescapable shock*. Behavioural Processes. 1990a, 21:127-41.
- Benus R.F., Den Daas S., Koolhaas J.M., et al. *Routine formation and exibility in social and non-social behaviour of aggressive and non-aggressive male mice*. Behaviour. 1990b, 112:176-93.
- Benus R.F., Bohus B., Koolhaas J.M., et al. *Heritable variation for aggression as a reflection of individual coping strategies*. Experientia. 1991, 47:1008-19.
- Bisazza A. *Social organization and territorial behaviour in three strains of mice*. Bollettino Zoologica. 1981, 48:157-67.
- Bisazza A. *Hereditary differences in social behaviour of male mice (Mus musculus L.)*. Bollettino Zoologica. 1982, 49:207-11.
- Brain P.F. and Parmigiani S. *Variation in aggressiveness in house mouse populations*. Biological Journal of the Linnean Society. 1990, 41:257-69.
- Broom D.M. and Johnson K.G. *Stress and Animal Welfare*. London: Chapman & Hall, 1993.
- Busser J., Zweep A., and Van Oortmerssen G.A. *Variability in the aggressive behaviour of Mus musculus domesticus, its possible role in population structure*. In: The Genetics of Behaviour (Van Abeelen JNF, Ed). Amsterdam: North-Holland. 1974, pág. 185-99.
- Crowcroft P. *Mice all Over*. London: Foulis, 1966.
- Gray S. and Hurst J.L. *The effects of cage cleaning on aggression within groups of male laboratory mice*. Animal Behaviour. 1995, 49:821-6.
- Guillot P.V. and Chapouthier G. *Intermale aggression, GAD activity in the olfactory bulbs and Y chromosome effect in seven inbred mouse strains*. Behavioural Brain Research. 1998, 90:203-6.
- Hebb D.O. *The effects of early experience on problem solving at maturity*. American Psychologist. 1947, 2:306-7.
- Hurst J.L., Fang J., and Barnard C.J. *The role of substrate odours in maintaining social tolerance between male house mice, Mus musculus domesticus*. Animal Behaviour. 1993, 45:997-1006.
- Mackintosh J.H. *Territory formation by laboratory mice*. Animal Behaviour. 1970, 18:177-83.
- Mackintosh J.H. *Factors affecting the recognition of territory boundaries by mice (Mus musculus)*. Animal Behaviour. 1973, 21:464-70.
- Mondragon R., Mayagoitia L., Lopez-Lujan A., et al. *Social structure features in three inbred strains of mice, C57Bl=6J, Balb=cj, and NIH: a comparative study*. Behavioral and Neural Biology. 1987, 47:384-91.
- National Research Council. *Recognition and Alleviation of Pain and Distress in Laboratory Animals*. Washington DC: National Academy Press, 1992.
- Nevison C.M., Barnard C.J., Beynon R.L., et al. *The consequences of inbreeding for recognizing competitors*. Proceedings of the Royal Society London, Series B. 2000, 267:687-94.
- Newberry R.C. *Environmental enrichment: Increasing the biological relevance of captive environments*. Applied Animal Behaviour Science. 1995, 44(2-4):229-43.
- Parmigiani S., Palanza P., Rodgers J., et al. *Selection, evolution of behavior and animal models in behavioral neuroscience*. Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 1999, 23:957-70.
- Sevenich MacPhee M., and Mellen J. *Husbandry training*. In: www.animaltraining.org.
- Sluyter F., Bult A., Lynch C.B., et al. *A comparison between house mouse lines selected for attack latency or nest-building: evidence for a genetic basis of alternative behavioral strategies*. Behavior Genetics. 1995, 25:247-52.
- Solís V. *Módulo de Función 4. Cuidado, salud y manejo de los animales nivel 2. Enriquecimiento y Condiciones Ambientales por Especie. Material docente para la obtención de la Función e. Animalaria*. 2016.
- Stanford University. School of Medicine. *Mouse ethogram*. 2017. Web: <https://web.stanford.edu/group/compmed/cgi-bin/index.php>.
- Van Oortmerssen G.A. *Biological significance, genetics and evolutionary origin of variability in behaviour within and between inbred strains of mice (Mus musculus) - a behavioural genetic study*. Behaviour. 1971, 38:1-92.

 **TECNIPLAST**



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

Luces y sombras de las herramientas CRISPR/Cas en la transgénesis animal

Sagrario Ortega

Unidad de Ratones Transgénicos. Programa de Biotecnología, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO).

Han pasado cinco años desde que Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier propusieran por primera vez la utilización del sistema CRISPR/Cas como herramienta de edición génica universal. Durante estos cinco años, laboratorios de todo el mundo han incorporado este sistema a su caja de herramientas genéticas particular y han demostrado su utilidad en áreas muy diferentes, incluyendo la reciente modificación de embriones humanos para corregir alteraciones genéticas incompatibles con la salud (Ma *et al.*, 2016). Una de las áreas en las que las herramientas CRISPR han tenido más impacto es la Biotecnología Animal, por su utilidad para introducir mutaciones dirigidas en la línea germinal de prácticamente cualquier especie. Sin embargo, el sistema CRISPR/Cas, en su estado actual, proyecta luces y sombras en la generación de animales modificados genéticamente que es importante conocer antes de optar por esta estrategia.

QUÉ ES Y QUÉ HA APORTADO CRISPR/CAS AL CAMPO DE LA TRANSGÉNESIS ANIMAL

La modificación genética de la línea germinal en animales es uno de los logros científicos más importantes de las últimas décadas. Gracias a ella ha sido posible avanzar en el conocimiento de la funcionalidad del genoma, así como generar modelos preclínicos de enfermedades. Durante más de veinte años, la única metodología disponible para modificar genes de forma dirigida y específica en la línea germinal de mamíferos ha sido la recombinación homóloga del ADN en células madre embrionarias, también llamada “*gene targeting*”. Esta tecnología se desarrolló a lo largo de la última década del siglo pasado y su impacto científico fue reconocido con la concesión del Premio Nobel de Fisiología y Medicina a los investigadores que la hicieron posible, Martin Evans, Mario Capecchi y Oliver Smithies en 2007. Pero el *gene targeting* tiene algunas limitaciones. Debido a la baja eficiencia de la recombinación de secuencias homólogas de ADN

en mamíferos, las modificaciones genéticas no pueden introducirse directamente en embriones, sino que es necesaria la utilización de células pluripotentes (células madre embrionarias o células ES) como vehículo de transferencia de mutaciones a la línea germinal. Sólo después de un análisis exhaustivo de cientos de clones de células ES en los que se ha incorporado un ADN exógeno es posible seleccionar algunos clones individuales portando la modificación génica deseada (recombinantes homólogos), y reconstruir un animal microinyectando estos clones en embriones huésped. Las únicas especies de mamíferos para las que hay disponibilidad de líneas de células ES con esta capacidad son el ratón y, en mucha menor extensión, la rata. Esto limita el uso de esta tecnología a estas especies. El cultivo de las células ES para mantener su pluripotencialidad (capacidad de generar todos los linajes celulares incluida la línea germinal) no es sencillo y requiere entrenamiento específico. A esto hay que añadir que el proceso de generar ratones a partir de células ES es largo y complejo.

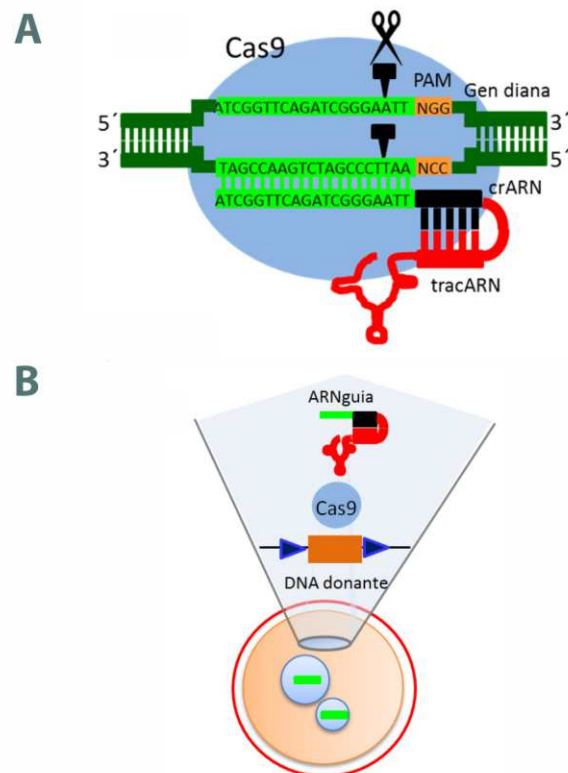
El desarrollo de herramientas de edición génica que permitieran superar las limitaciones del *gene targeting* ha sido un reto en los últimos diez-veinte años. Las primeras endonucleasas dirigidas, las ZFN (Zinc Finger Nucleases) y las TALENs (Transcription Activator-Like Endonucleases) son enzimas artificiales que introducen roturas de doble cadena en secuencias predefinidas del genoma. La rotura de doble cadena es una lesión letal que la célula debe reparar para sobrevivir y para ello dirige toda su maquinaria de reparación al sitio de corte, aumentando así en órdenes de magnitud la eficiencia de reparación. La reparación puede hacerse por dos mecanismos diferentes. El mecanismo más básico, NHEJ o unión de extremos no homólogos, es un proceso poco específico que da lugar a la introducción de mutaciones llamadas INDELS (INserción-DElección), que son pequeñas inserciones o eliminaciones (deleciones) de material genético en el sitio de corte. Si el corte de

la endonucleasa se dirige hacia una secuencia codificante, la reparación mediante INDELS puede resultar en un cambio de marco de lectura o en otra mutación que dé lugar a una proteína no funcional, generándose un alelo *knockout*. Alternativamente, la rotura puede ser reparada por recombinación homóloga, bien con la cadena complementaria del ADN, en cuyo caso se restaura el alelo original (*wild type*) o suministrando un fragmento de ADN exógeno, homólogo a la secuencia de nucleótidos que flanquea el punto de corte en el genoma. Este ADN exógeno puede ser diseñado para introducir mutaciones semejantes a las que se pueden introducir por *gene targeting*: *knockout*, *knockin*, mutaciones condicionales, etc., dirigidas al sitio de corte, sólo que, debido a la presencia de esta rotura, la reparación por recombinación homóloga es mucho más eficiente. Esto hace innecesario el uso de células ES, permitiendo realizar mutagénesis dirigida del genoma directamente en cigotos mediante inyección de los componentes en el pronúcleo o incluso en el citoplasma de embriones de una célula. Estas endonucleasas dirigidas, si bien supusieron un gran avance tecnológico en especies para las que no se dispone de células ES pluripotentes -como cerdo, oveja, o incluso rata- no han sido una alternativa real al *gene targeting* en ratón, el modelo animal más utilizado para estudios genéticos, debido a su complejidad y, en muchos casos, su baja eficiencia.

Pero, una vez más, los microorganismos han demostrado ir por delante de nosotros en el diseño de herramientas genéticas. Algunas bacterias y *archaeas* han desarrollado un sistema enzimático natural para introducir roturas de doble cadena en secuencias pre-definidas del ADN, que supera en muchos aspectos a las endonucleasas ZFN y TALEN, diseñadas por la mente humana. Expertos microbiólogos llevaban muchos años estudiando unas agrupaciones de secuencias repetidas en el genoma de estos microorganismos tratando de entender, por puro interés científico, qué significaban y para qué servían. Estos estudios, al cabo de los años, llevaron a la conclusión de que estas repeticiones denominadas CRISPR, acrónimo de Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (nombre propuesto por Francis Mojica, Catedrático de Microbiología en la Universidad de Alicante, uno de los pioneros en el estudio de estos sistemas) son parte de un mecanismo de defensa natural o de inmunidad frente a la invasión de ADN exógeno proveniente de bacteriófagos o de plásmidos. El mejor caracterizado y más utilizado de estos sistemas es el de la bacteria *Streptococcus pyogenes* (*Sp*), pero actualmente se conocen diecinueve sistemas CRISPR englobados en seis tipos diferentes (Wright *et al.*, 2016).

Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier propusieron por primera vez en 2012 la utilización del sistema CRISPR/Cas de *Sp*

como herramienta de edición génica universal en cualquier especie (Jinek *et al.*, 2012). Para ello, sólo dos componentes de este sistema son esenciales: la proteína Cas9 (CRISPR-associated protein 9), una endonucleasa que introduce roturas de doble cadena en el ADN y una pequeña molécula de ARN, llamada ARN guía, que interacciona con la proteína Cas9 y la dirige a cualquier posición en el genoma cuya secuencia sea complementaria a la del propio guía. El ARN guía está formado, a su vez, por dos pequeños ARNs que interaccionan entre sí: el ARN transactivador (TracRNA) que se une a la nucleasa Cas9, y el CRISPR ARN (CrRNA) que contiene una secuencia de 20 nucleótidos que dirige el complejo Cas9-guía a la secuencia de ADN complementaria a estos 20 nucleótidos. El TracRNA y el crRNA pueden unirse artificialmente mediante un puente de 4 nucleótidos formando una sola molécula. Es necesario construir un ARN guía para cada secuencia que se quiera cortar en el genoma, modificando, para cada caso, esta secuencia de 20 nucleótidos. El único requisito es que la secuencia de ADN complementaria al guía se encuentre inmediatamente seguida por el triplete NGG (llamado PAM o Protospacer Adjacent Motif) en la dirección 3', donde N es cualquier base A, C, G o T. Si se da este requisito, Cas9 cortará el ADN entre el tercer y el cuarto nucleótido anteriores (en dirección 5') a la secuencia PAM (ver Figura 1A).



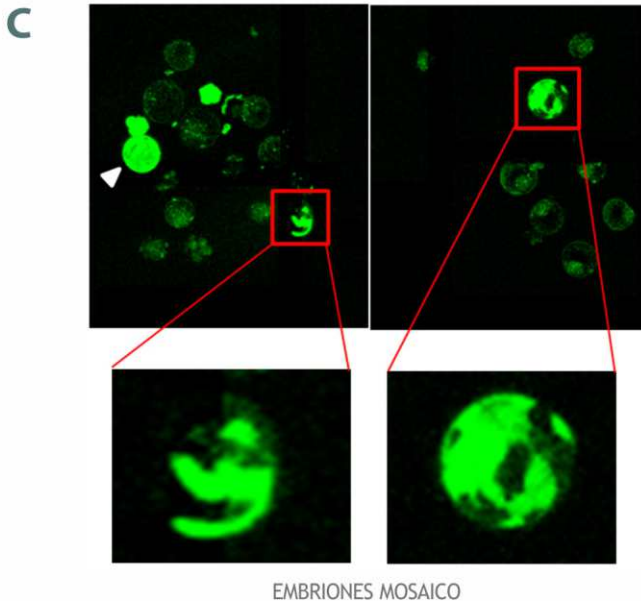


Figura 1.- Complejo CRISPR/Cas y su utilización para edición génica en embriones. **A:** Esquema del complejo endonucleasa Cas9/ARN guía que contiene la secuencia de 20 nucleótidos complementaria al gen diana. La secuencia PAM (NGG) se muestra en naranja y las tijeras muestran la posición en que corta Cas9 las dos cadenas del ADN. **B:** Esquema de la introducción de los componentes del sistema en cigotos por microinyección. **C:** Ejemplo de mosaicismo en embriones que contienen una copia de GFP, microinyectados con Cas9 y un ARN guía para generar un knockout (KO) de GFP. Los embriones se inyectaron en estadio de cigoto y se cultivaron in vitro hasta blastocisto. Los embriones ampliados son mosaicos de células GFP KO y células que siguen expresando GFP. La flecha indica un embrión en el que CRISPR no ha funcionado.

El sistema CRISPR/Cas funciona de forma muy similar a como lo hacen las otras endonucleasas dirigidas, ZFNs y TALENs, pero hay dos diferencias fundamentales: la interacción ARN-ADN que dirige la endonucleasa Cas9 a su secuencia diana es más fuerte que la interacción proteína-ADN que tiene lugar en el caso de las ZFNs y TALENs, lo que hace el sistema CRISPR/Cas más eficiente; además, CRISPR/Cas es un sistema natural exportado de las bacterias, en lugar de algo construido por ingeniería genética y, en consecuencia, mucho más fácil de manejar. Ya no es necesario ensamblar toda una enzima en el tubo de ensayo para cortar el genoma en cada sitio elegido, basta con modificar 20 nucleótidos en la molécula del ARN guía, lo que es extremadamente sencillo para los biólogos moleculares.

En 2013, el grupo de Feng Zhang en MIT (*Massachusetts Institute of Technology*) demostró por primera vez la utilidad del sistema para edición génica en células cultivadas (Cong *et al.*,

2013) y poco después, el grupo de Rudy Jaenisch (MIT) en colaboración con Feng Zhang publicó por primera vez, en la revista *Cell*, la utilización del sistema CRISPR/Cas para introducir mutaciones dirigidas, *knockout*, *knockin* y alelos condicionales sin necesidad de emplear células ES (Wang *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013) inyectando directamente en cigotos de ratón los componentes del sistema: la endonucleasa Cas9, el ARN guía y un ADN exógeno para reparar la rotura por recombinación homóloga. Esto ha sido un hito muy importante en la generación de ratones modificados genéticamente, ya que muchos laboratorios en los que no estaba establecida la tecnología de células ES ahora tienen la posibilidad de generar todos estos alelos sofisticados en el genoma utilizando prácticamente la misma tecnología que para la generación de ratones transgénicos convencionales, descrita por primera vez por Gordon y Ruddle en 1980. Aunque esto ya era posible con las endonucleasas ZFN y TALEN, CRISPR ha simplificado y ha hecho mucho más asequible y eficiente este tipo de abordajes, por lo que su uso ha crecido exponencialmente en estos cuatro últimos años, no sólo para la generación de ratones modificados genéticamente, sino también para editar el genoma de otras especies animales.

VENTAJAS DEL SISTEMA CRISPR/CAS

El acrónimo "FREE" define los principales atractivos del sistema CRISPR/Cas: Fácil, Rápido, Eficaz, Económico. Pero además FREE (libre) representa lo sorprendentemente accesibles que son estas herramientas, otra de sus grandes cualidades.

Tanto la endonucleasa Cas9 como los ARN guías pueden ser adquiridos de diversas casas comerciales. Pero si un laboratorio está interesado en generar sus propios reactivos, en aproximadamente un par de semanas puede hacerlo a partir de herramientas ya disponibles y utilizando protocolos muy básicos de biología molecular. Addgene, <http://www.addgene.org>, una organización sin ánimo de lucro en la que laboratorios de todo el mundo depositan herramientas moleculares que han generado y utilizado en trabajos publicados, tiene una sección dedicada a herramientas CRISPR/Cas y pone estos reactivos a disposición de la comunidad científica. Asimismo, laboratorios dedicados al desarrollo de la tecnología CRISPR/Cas - entre otros el de Feng Zhang en MIT (<http://crispr.mit.edu>), disponen, en su página web, de programas de libre acceso en los que se pueden analizar las secuencias de ADN que se quieren modificar y seleccionar la guía o guías óptimas dirigidas a dichas secuencias, en base a su eficacia y a su menor riesgo de reconocer otras secuencias similares en el genoma. Todas estas herramientas están disponibles para cualquier aplicación en investigación

básica, pero el sistema es objeto de patente para su utilización con fines comerciales. Actualmente, el Broad Institute (Harvard/MIT) en Cambridge y Feng Zhang poseen la patente para la utilización de CRISPR como herramienta de edición génica en células eucariotas, pero la lucha por los derechos de la propiedad intelectual continúa entre este instituto y la Universidad de Berkeley a la que pertenece Jennifer Doudna. Varios laboratorios europeos también han entrado en litigio por la propiedad de ciertos aspectos del sistema, por lo que el veredicto final todavía está pendiente.

Cualquier laboratorio técnicamente capaz de generar ratones transgénicos por microinyección de ADN en pronúcleo, puede ahora también generar ratones *knockout* o *knockin* con CRISPR. La microinyección de los componentes del sistema CRISPR se puede hacer en el pronúcleo o en el citoplasma del cigoto (ver Figura 1B). En nuestra experiencia no hemos visto diferencias en la eficiencia de la generación de alelos *knockout* o *knockin* entre estos dos métodos de microinyección. La elección de uno u otro depende, sobre todo, de las preferencias particulares y de la experiencia previa de cada laboratorio. Alternativamente, la electroporación puede ser usada también para introducir los componentes de CRISPR en cigotos (Hashimoto and Takemoto, 2015) si no se tiene experiencia en microinyección.

El tiempo necesario para generar ratones mutantes, hasta la F0 (animales que nacen de la sesión de microinyección) se acorta considerablemente con CRISPR. No sólo se acorta el tiempo empleado en generar los reactivos, sino que la obtención de los animales modificados genéticamente es también más rápida. Al suprimir la necesidad de generar quimeras a partir de células ES se elimina uno de los cuellos de botella más importantes del *gene targeting*, ya que éste depende enteramente de la calidad de las células ES y de su capacidad de contribuir a la línea germinal. La eficiencia en la generación de alelos *knockout* por creación de INDELS o por delección de secuencias es generalmente superior al 30% de los embriones inyectados, y muchas veces superior al 80%. Además, muy frecuentemente, la microinyección de CRISPR produce animales homocigotos *knockout* en la F0, por modificación de los dos alelos en el cigoto. Aunque el mosaicismo puede ser un obstáculo para estudiar estos mutantes homocigotos en la F0, como veremos más adelante, en esta primera generación se puede obtener ya alguna información de cuál puede ser el fenotipo asociado a la mutación introducida, y estos primeros animales que nacen de la inyección deben ser cuidadosamente controlados y observados.

En muchos casos puede resultar más económico, fácil y rápido generar un nuevo ratón *knockout* con CRISPR que importar la línea *knockout*, si ya existe, de otro laboratorio o fuente comercial. Esto es particularmente cierto cuando se trata de incorporar el nuevo alelo *knockout* a una línea modificada genéticamente ya existente. Muchos de los modelos genéticos con los que se trabaja en investigación (por ej., modelos de cáncer) son líneas con genotipos complejos conteniendo frecuentemente más de cuatro o cinco alelos modificados genéticamente. Introducir un nuevo alelo mutante en estas líneas de ratón mediante cruces implica generalmente muchos meses de espera y un gran número de cruces hasta obtener el genotipo deseado. CRISPR facilita este proceso, puesto que la nueva mutación puede ser introducida directamente en cigotos de la línea mutante que ya poseen la combinación de alelos mutantes deseada, con una eficiencia relativamente alta.

LIMITACIONES DEL SISTEMA CRISPR/CAS

CRISPR/Cas facilita y acelera muy significativamente la primera fase de la generación de ratones mutantes, pero a partir de la F0, el panorama se complica considerablemente.

Una de las limitaciones más importantes es el MOSAICISMO: el animal que nace del cigoto inyectado frecuentemente tiene modificaciones genéticas diferentes en diferentes células. El sistema CRISPR/Cas sólo corta el genoma en una secuencia predeterminada por la secuencia del ARN guía, pero a continuación, la reparación de esa rotura es un proceso no controlado que da lugar a la introducción de mutaciones, que pueden ser diferentes en cada célula, e incluso en la misma célula, en cada uno de los dos alelos del gen diana (ver Figura 1C). Aunque CRISPR se inyecta en el embrión de una célula, el corte del ADN se puede producir después de que el embrión se haya dividido en dos o más células, de forma que, en cada una, la reparación será diferente. Como consecuencia, cada animal que nace de una sesión de microinyección portará una combinación única de mutaciones, que puede llegar a incluir más de una decena de alelos diferentes. Esto hace que el genotipado de la F0 sea también complejo. Generalmente, se genotipa una pequeña biopsia del extremo de la cola del animal, pero este tejido puede no ser representativo de las mutaciones presentes en la línea germinal y las mutaciones encontradas pueden no ser transmitidas a la descendencia. El problema se incrementa exponencialmente cuando se usa CRISPR para introducir más de un alelo mutante a la vez, en el mismo embrión, utilizando varias guías simultáneamente (sistema multiplex) en combinación con la endonucleasa Cas9. Aunque con CRISPR este tipo de abordaje

Reproducción y genética

es posible, el genotipado de la F0 puede resultar tan complejo que puede ser más práctico, en general, introducir las modificaciones genéticas una a una y después cruzar entre sí los animales, seleccionados por su genotipo en la F1.

Todo esto hace que el genotipado de los animales generados con CRISPR sea lento y costoso, y en muchos casos un verdadero cuello de botella. Analizar la transmisión de una mutación en particular puede implicar también un elevado número de animales y de cruces. Cuando esto ocurre, puede ser conveniente recurrir a congelar espermatozoides de los machos F0, como una opción para salvaguardar la línea germinal de los posibles *founders* y reducir el número de cruces y de animales en uso. El genotipado de este espermatozoides puede ser más informativo, en muchos casos, que el de la biopsia de cola para detectar las mutaciones que se transmitirán vía línea germinal. En el caso de las hembras F0 se puede recurrir a la congelación de ovarios u oocitos, aunque estos procedimientos son técnicamente más complicados y la recuperación puede ser menos eficiente. En la generación de alelos *knockin* por CRISPR, especialmente en la introducción de pequeños cambios de secuencia (mutaciones puntuales) es importante diseñar bien la secuencia del ADN donante de forma que, además de la mutación deseada, se introduzcan otras modificaciones que faciliten el genotipado de la F0. Siempre que sea posible se debe considerar la creación de una nueva diana de restricción o la eliminación de una existente. Estas modificaciones adicionales deben estar lo más cercanas posible a la mutación que se quiere introducir y deben ser silenciosas, es decir, no modificar la secuencia de aminoácidos en el caso de tratarse de un gen codificante para una proteína.

Otra de las desventajas más importantes del sistema CRISPR/Cas, y en general de las endonucleasas dirigidas (ZNFs, TALENs) respecto al *gene targeting*, es la creación de mutaciones "off target" o inespecíficas que se producen en otras posiciones del genoma cuya secuencia tiene homología parcial con la del ARN guía. En el caso de la utilización de CRISPR/Cas directamente en embriones, la frecuencia de mutaciones inespecíficas parece ser menor que la que se obtiene en cultivos celulares. Probablemente, el corto tiempo de exposición al complejo endonucleasa/guía y quizás una menor accesibilidad de la cromatina en el caso de los embriones, comparado con las células proliferando en cultivo, puede hacer que se produzca el corte del ADN sólo en la secuencia más favorable, es decir, la que es 100% complementaria a la secuencia del ARN guía. En cualquier caso, conviene comprobar que no hay cortes inespecíficos al menos en las 10 secuencias más parecidas a la del guía o, si los hay, comprobar que no se transmiten a la siguiente generación.

Por último, aunque CRISPR hace posible la generación de alelos *knockin* directamente en embriones, no se puede considerar todavía una tecnología lo suficientemente robusta para la obtención de cualquier alelo *knockin*. En general, la introducción de mutaciones puntuales, por ejemplo para modificar uno o varios aminoácidos consecutivos en una secuencia codificante, o la integración de pequeñas secuencias en una posición concreta del genoma, sitios loxP/frt o secuencias que codifican pequeñas colas de unos cuantos aminoácidos, es relativamente eficiente (10-20%); sin embargo, la inserción de secuencias más grandes, por ejemplo la secuencia codificante de genes como GFP o CreERT2 o la creación de un alelo condicional por integración de dos secuencias loxP o frt, son bastante menos eficientes. Nuevos métodos aparecen continuamente en la literatura describiendo condiciones que mejoran esta eficiencia. La utilización de largos fragmentos de ADN de cadena sencilla en lugar de ADN de doble cadena, por ejemplo, parece mejorar la eficiencia de la reparación por recombinación homóloga (Quadros *et al.*, 2017).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La tecnología CRISPR/Cas ha supuesto un antes y un después en la transgénesis animal facilitando la introducción de mutaciones dirigidas en la línea germinal de muchas especies. Sin embargo, hoy por hoy, CRISPR/Cas tiene también importantes limitaciones que con frecuencia resultan en un incremento en el número de animales a utilizar y en una mayor complejidad a la hora de identificar las mutaciones relevantes. La optimización de la reparación por recombinación homóloga (frente a NHEJ) que permita reducir el mosaicismo, junto con el desarrollo de sistemas más fieles, que reduzcan la frecuencia de mutaciones inespecíficas (*off-target*) contribuirá a superar, en gran parte, estas dificultades. Mientras tanto, el uso de las herramientas CRISPR para hacer más eficiente la recombinación homóloga en células ES puede ser una alternativa para la generación de mutaciones complejas.

Por otro lado, modificaciones del sistema CRISPR/Cas original permiten su aplicación no sólo para introducir o corregir mutaciones en el genoma sino también para controlar la expresión de genes (Pérez-Pinera *et al.*, 2013), alterar el patrón epigenético del genoma (Hilton *et al.*, 2015), análisis por imagen molecular de estructuras genómicas como telómeros (Ma *et al.*, 2016), etc.

La aplicabilidad de las herramientas CRISPR/Cas a la edición génica, no sólo en el ratón o en la rata, sino también en grandes

mamíferos como cerdos o primates (Reardon, 2016) permitirá avanzar en la generación de modelos preclínicos de enfermedades genéticas en especies más próximas fisiológicamente a los humanos, así como abrir nuevos horizontes a la Biotecnología Animal.

BIBLIOGRAFÍA

- Cong L., Ran F.A., Cox D., et al. *Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems*. Science. 2013, 339:819-23.
- 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, 5:11315-20.
- Hilton I.B., D'Ippolito A.M., Vockley C.M., et al. *Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers*. Nat Biotechnol. 2015, 33:510-7.
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., et al. *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*. Science. 2012, 337:816-21.
- Ma H., Tu L.C., Naseri A., et al. *Multiplexed labeling of genomic loci with dCas9 and engineered sgRNAs using CRISPRainbow*. Nat. Biotechnol. 2016, 34:528-30.
- Perez-Pinera P., Kocak D.D., Vockley C.M., et al. *RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors*. Nat Methods. 2013, 10:973-6.
- Quadros R.M., Miura H., Harms D.W., et al. *Easi-CRISPR: a robust method for one-step generation of mice carrying conditional and insertion alleles using long ssDNA donors and CRISPR ribonucleoproteins*. Genome Biol. 2017, 18:1220-4.
- Reardon S. *The CRISPR Zoo*. Nature. 2016, 531:160-3.
- Wang H., Yang H., Shivalila C.S., et al. *One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering*. Cell. 2013, 153:910-8.
- Wright A.V., Nuñez J.K., and Doudna J.A. *Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature's Toolbox for Genome Engineering*. Cell. 2016, 164:29-44.
- Yang H., Wang H., Shivalila C.S., et al. *One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering*. Cell. 2013, 154:1370-9.



PUBLIQUE SUS
ARTÍCULOS EN
NUESTRA REVISTA.
CONTÁCTENOS

www.secal.es

International Product Supplies Limited



Feeding the Innovations of Modern Research

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

TestDiet® Europe

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

www.testdiet.com



LabDiet.

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

www.labdiet.com



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

Sodispan Research S.L.

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

Modelos alternativos en investigación de enfermedades infecciosas

Oscar Zaragoza, PhD

Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III.

La investigación en enfermedades infecciosas ha sido uno de los campos prioritarios en medicina en los últimos siglos. El uso de modelos animales ha sido determinante en esta área, ya que su utilización ha permitido definir los agentes causantes de estas enfermedades, así como los mecanismos de interacción entre los patógenos y el huésped. En las últimas décadas, el desarrollo de la biología molecular ha permitido ahondar en el conocimiento de los mecanismos de virulencia, así como de la respuesta inmune desarrollada ante estos microorganismos. Además, los modelos animales también han sido importantes para evaluar la eficacia de nuevos fármacos y con ello, mejorar las estrategias terapéuticas disponibles.

Aunque el uso de modelos animales (principalmente roedores, lagomorfos y perros) es necesario en el avance del conocimiento de las enfermedades infecciosas, los problemas bioéticos asociados suponen hoy en día una limitación. Muchos modelos de infección pueden inducir una sepsis aguda y múltiples alteraciones fisiológicas en los animales. Para reducir el sufrimiento animal, en los últimos años se han implantado una gran cantidad de medidas bajo el amparo de diferentes reales decretos y leyes que regulan la experimentación animal. En particular, el Real Decreto 53/2013 establece las condiciones necesarias para llevar a cabo experimentos con animales protegidos. Este real decreto también define las categorías profesionales requeridas para el manejo de animales (categorías A, B, C y D), que han sido reformuladas en la Orden ECC/566/2015 de 20 de Marzo de 2015 (funciones a, b, c, d y e). El principal objetivo de estas leyes es disminuir el dolor y sufrimiento animal, y tiene un beneficio no sólo bioético, sino también científico, ya que la mejora de las condiciones en las que se realizan los experimentos reduce el número de factores que pueden alterar los resultados. En este contexto, las leyes enfatizan la aplicación de la regla de las 3Rs, que fue formulada por primera vez por Russell y Burch (1), y que implica **Reducir** el número de animales utilizados

en experimentación, **Reemplazar** dichos animales por otros no protegidos que posean un sistema nervioso primitivo y en los que la sensación de dolor sea mínima, y **Refinar** los procedimientos para llevarlos a cabo en las condiciones más humanas posibles.

Así pues, y con el fin de implantar la regla de las 3Rs en el campo de las enfermedades infecciosas, hay cada vez una mayor tendencia al uso de modelos no convencionales y no protegidos por la ley para investigar mecanismos de virulencia, respuesta inmune y eficacia de tratamientos antimicrobianos. Entre estos modelos, se encuentran lepidópteros, insectos y nematodos (2,3).

Un concepto de la regla de las 3Rs es que estas recomendaciones no son excluyentes. Al contrario, la aplicación de una de ellas implica la aplicación de las otras. Por ejemplo, reemplazar los animales protegidos por otros modelos no implica eliminarlos totalmente, pero sí reducir el número utilizado. De la misma manera, el refinar los procedimientos también implica una reducción en el número de animales usados. Por esta razón, a día de hoy, el uso de huéspedes alternativos no hay que contemplarlo como una opción para reemplazar totalmente a los animales protegidos, sino más bien para reducir el número y diseñar mejores experimentos.

Otra de las consideraciones que hay que tener en cuenta es hasta qué punto es válido utilizar modelos alternativos. En este aspecto hay bastante confusión, ya que hay investigadores contrarios a su uso debido a su baja homología con vertebrados y mamíferos. Por otra parte, otros investigadores proponen su uso como un modelo válido para investigar mecanismos de enfermedad, virulencia, etc. En mi opinión, en este debate no hay una postura objetiva y, por lo tanto, es fácil posicionarse en cualquiera de las tendencias. Posiblemente, lo más razonable sea una posición intermedia, para la que es necesario conocer qué información ofrecen los modelos no convencionales y

alternativos, y para qué tipo de abordajes pueden ser utilizados. También es recomendable conocer las limitaciones de estos modelos y decidir en qué tipo de experimentos pueden ser utilizados y en cuáles no, sin pretender utilizarlos de manera universal, pero teniendo en cuenta siempre su uso y su potencial.

En esta revisión, voy a ofrecer una visión general de los principales modelos alternativos utilizados en la investigación de enfermedades infecciosas, señalando en cada caso sus mecanismos de respuesta inmune, los principales aspectos técnicos a considerar y las principales ventajas y desventajas.

LEPIDÓPTEROS: GALLERIA MELLONELLA

Galleria mellonella es un lepidóptero que puede encontrarse en forma larvaria, pupa o polilla. Es conocida como la gran polilla de la miel o de la cera, ya que es una plaga de colmenas. Debido a su tamaño, es ampliamente utilizado como cebo vivo para pequeñas mascotas y en pesca. Durante su ciclo de vida, las polillas adultas se encuentran como machos y hembras. Tras el apareamiento y deposición y eclosión de los huevos, las larvas se desarrollan durante varios estadios, proceso que dura alrededor de 4 semanas, aunque puede extenderse a meses si se incuban a bajas temperatura. El tamaño de las larvas adultas es de 3-4 cm, lo que las hace fáciles de manejar y visualizar. Finalmente, las larvas entran en estado de pupa, que tras varios días, resulta en la aparición de las polillas (4; ver esquema en la Figura 1).

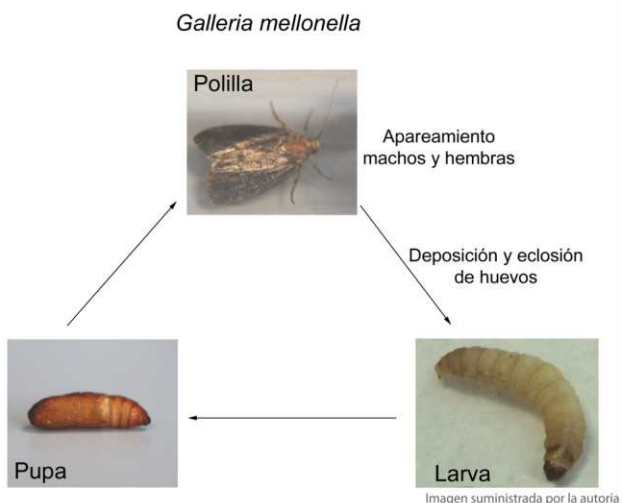


Figura 1.- Diferentes fases en las que se puede encontrar *Galleria mellonella* durante su ciclo de vida.

Este lepidóptero se ha situado como uno de los principales modelos alternativos para investigar factores de virulencia y enfermedades infecciosas causadas por bacterias y hongos. Para este propósito, se utilizan principalmente larvas adultas, en un estadio anterior a la pupa (alrededor de 3 semanas antes). La estructura de la larva es muy sencilla, ya que consta de un tubo digestivo y un tubo neural que recorre la parte dorsal y cuerpo graso, siendo la mayor parte del contenido un líquido denominado hemolinfa.

Respuesta inmune de *G. mellonella*

La respuesta inmune de *Galleria mellonella* es innata, y tiene parte celular y parte humoral (5; ver esquema en la Figura 2). El principal componente de la respuesta celular está compuesto por hemocitos, que son células con capacidad fagocítica y de producir compuestos antimicrobianos. Se han descrito hasta seis clases diferentes de hemocitos. Con respecto al componente humoral, comprende principalmente enzimas líticas (lisozima), péptidos antimicrobianos (AMPs, como galerimicina, gloverina y defensinas entre otros; ver 6) y la síntesis de melanina. Este último componente se forma en respuesta a la introducción de partículas extrañas, y forma unos acúmulos o nódulos fácilmente visibles en secciones histológicas cuya principal función es contener la replicación de microorganismos en la hemolinfa.

Respuesta inmune de *Galleria mellonella*

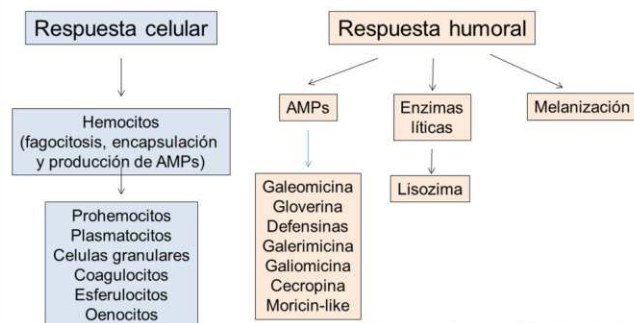


Figura 2.- Principales componentes de la respuesta inmune de *G. mellonella*.

Galleria mellonella como modelo de huésped

Galleria mellonella se ha utilizado ampliamente en las últimas décadas para investigar mecanismos de virulencia de patógenos, así como la efectividad de compuestos antimicrobianos. La infección se realiza por introducción directa de los

microorganismos en la hemolinfa mediante microinyección (alrededor de 10 microlitros¹). A los pocos minutos de la inoculación, se suelen observar manchas negras alrededor de la zona de inyección, debido a la acumulación de melanina en esa zona. Después, es muy sencillo visualizar la supervivencia de las larvas, de manera que las larvas muertas pierden su movilidad y además se tornan de color oscuro debido a una melanización masiva.

La primera vez que se utilizó *G. mellonella* como modelo de huésped en experimentos de infección fue en los años 50 del siglo pasado. Sin embargo, su principal uso ha emergido en los últimos 15 años. Existen en la actualidad numerosas publicaciones que apoyan el uso de este modelo frente a infecciones bacterianas y fúngicas. También es un modelo que se ha utilizado con éxito para ver la eficacia *in vivo* de fármacos antimicrobianos durante infecciones causadas por cepas sensibles y resistentes (se pueden consultar algunos ejemplos en 7-21). La facilidad que ofrece este modelo también permite realizar rastreos masivos de colecciones de cepas de microorganismos mutantes para identificar genes involucrados en virulencia (22). Además de supervivencia, *G. mellonella* puede utilizarse para investigar la respuesta innata, ya que es sencillo medir el grado de melanización de la hemolinfa, la producción de AMPs y la capacidad fagocítica de los hemocitos (18). Este lepidóptero ha llegado incluso a utilizarse como modelo para investigar infecciones cerebrales (23). Por último, es un modelo óptimo para investigar la eficacia de fármacos antimicrobianos debido a su fácil administración y a la facilidad para evaluar su efectividad en la supervivencia.

Ventajas y desventajas del modelo de *G. mellonella*

Las principales ventajas que ofrece este modelo son: 1) Es fácil de implantar en cualquier laboratorio sin necesidad de adquirir equipamientos especiales, más allá de las pipetas de microinyección. 2) Debido a su tamaño y ciclo de vida, las larvas son fáciles de manejar y no es necesario personal con una formación específica. 3) Es muy fácil determinar la viabilidad de las larvas. 4) Su precio las hace muy asequibles para los laboratorios, incluso aquellos de recursos limitados. 5) Es posible administrar dosis exactas de fármacos y de microorganismos. 6) Se pueden incubar en un rango amplio de temperaturas. Aunque la temperatura óptima de crecimiento es la ambiental y hasta los 30°C, las larvas toleran bien la incubación a 37°C, con lo que es posible realizar experimentos a la temperatura corporal humana.

1. Video disponible en https://www.youtube.com/watch?v=2XEu_5aF1qk&t=22s

El uso de *G. mellonella* también presenta algunas limitaciones. Por ejemplo, su genoma no es conocido y no es posible realizar manipulación genética. Además, también puede ser una limitación disponer de un proveedor fiable que proporcione las larvas en condiciones óptimas, ya que la mayoría de las veces se adquieren de criaderos de cebo vivo, que normalmente no controlan ni el estadio ni la ausencia de infección. Existen algunos distribuidores que crían las larvas específicamente para investigación, aunque normalmente a un precio mucho más caro. Una posibilidad para solucionar este problema es establecer la cría en los laboratorios. Este proceso, aunque es relativamente sencillo, requiere de espacio confinado para evitar la liberación de las polillas, así como de una planificación muy ordenada para realizar los experimentos en el momento en el que se dispone de larvas del tamaño adecuado.

NEMATODOS: *CAENORHABDITIS ELEGANS*

Otro de los modelos ampliamente utilizados en investigación de enfermedades infecciosas es el gusano *Caenorhabditis elegans*. Es un gusano de vida libre que se encuentra en el ambiente y tiene un tamaño pequeño, de 1-2 mm en la fase adulta. Su implantación como modelo de investigación tiene su origen en los trabajos clásicos de Sydney Brenner, quien obtuvo el premio Nobel gracias a sus trabajos sobre genética del desarrollo en este modelo (24,25).

Los gusanos de esta especie son hermafroditas y sólo una pequeña población son machos (ver revisión en 26). Tras la autofecundación y deposición de huevos (que puede ser de 200-300 por individuo), las larvas pasan por varios estadios de crecimiento (de L1 a L4; ver adulto en la Figura 3), aunque en condiciones ambientales de estrés pueden entrar en una fase de resistencia denominada Dauer, en la que pueden permanecer meses.



Imagen suministrada por la autoría

Figura 3.- Imagen de *C. elegans* adulto tomada con un microscopio confocal.

Caenorhabditis elegans es uno de los modelos más ampliamente utilizados en investigación sobre desarrollo, cáncer, enfermedades neuronales, envejecimiento, muerte celular y genética. Su cuerpo es transparente, lo que hace fácil la visualización de estructuras internas. Además, fue el primer organismo pluricelular secuenciado completamente en 1998, y se dispone de una gran variedad de herramientas genéticas que han permitido poder obtener mutantes de manera fácil. Su anatomía y estructura están perfectamente definidas, hasta el punto de que se conoce el número exacto de células del gusano adulto.

Sistema inmune de *C. elegans*

Caenorhabditis elegans posee principalmente respuesta inmune innata. Los principales componentes son las barreras exteriores y los mecanismos de evasión (ver esquema en la Figura 4). Este gusano desarrolla un comportamiento que le permite evadir agentes infecciosos (27). Este proceso se produce mediante el reconocimiento por neuronas quimiosensitivas de determinados componentes producidos por patógenos, que inducen una respuesta de evasión. Se han descrito algunas moléculas producidas por determinadas bacterias que son capaces de inducir este proceso (27).

Respuesta inmune de *Caenorhabditis elegans*

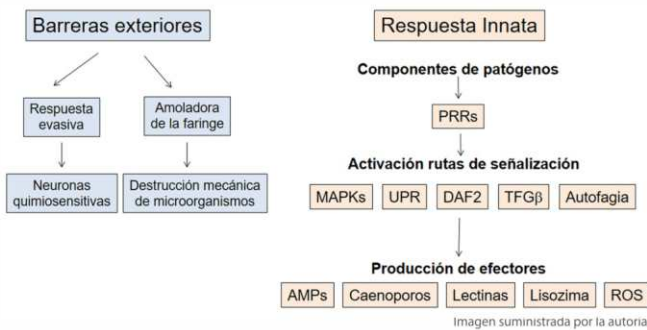


Figura 4.- Resumen de los principales mecanismos de defensa inmune de *C. elegans*.

Otro de los mecanismos que posee *C. elegans* para evitar la infección es la destrucción mecánica de los microorganismos en la amoladora de la faringe, que es una estructura que se encarga de degradar mecánicamente partículas exógenas y microorganismos para que sean digeridas en el intestino (ver Figura 5).

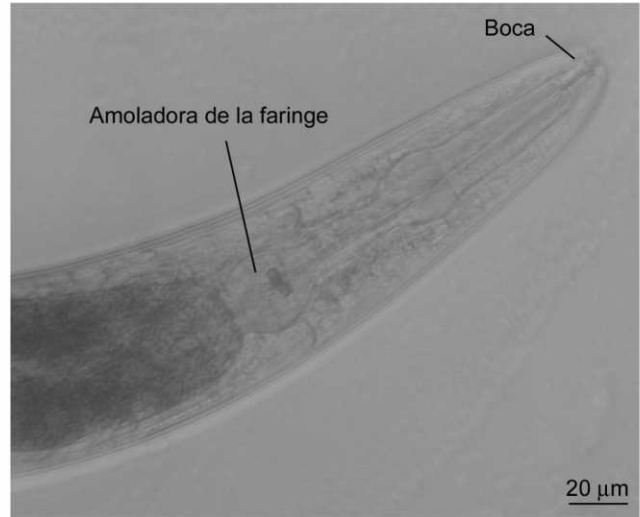


Imagen suministrada por la autora

Figura 5.- Detalle de la parte de la boca y de la parte inicial del intestino de *C. elegans*, en la que se aprecia la amoladora de la faringe.

Además de las barreras exteriores, *C. elegans* posee mecanismos de respuesta inmune innata (ver revisión en 28). Curiosamente, *C. elegans* carece de células fagocíticas especializadas en captura y eliminación de patógenos. Las células del intestino poseen receptores del tipo PRR (*pattern recognition receptors*), que reconocen componentes de patógenos, como la pared celular bacteriana y fúngica, ADN y ARN. Estos receptores activan diferentes rutas de señalización, siendo las principales la dependiente de MAPKs, la ruta de respuesta a proteínas no plegadas (UPR, *unfolded protein response*), la ruta de DAF-2 (*insuline-like*), TGF- β y autofagia. Estas rutas activan la producción de péptidos antimicrobianos, caenoporos, lisozima, lectinas y radicales libres de oxígeno, que se encargan de atacar y degradar a los microorganismos que logran penetrar al interior de la larva.

Caenorhabditis elegans como modelo de huésped

En el caso de las enfermedades infecciosas, se ha demostrado que *C. elegans* tiene un gran potencial como uso de huésped alternativo. La infección de los gusanos se realiza por ingestión de los microorganismos de interés. En condiciones de laboratorio, *C. elegans* se mantiene en presencia de la bacteria *Escherichia coli* (cepa OP50), la cual ingiere y le sirve de nutriente. Para realizar infecciones, los gusanos se transfieren durante varias horas a placas de agar que contienen extensiones con nuestro microorganismo de interés. Tras ese tiempo, las larvas se transfieren a placas o a medio líquido, donde se monitorizan los

parámetros a investigar. Hay que tener en cuenta que las larvas adultas pueden producir huevos y, por lo tanto, a lo largo del experimento se puede obtener una población mixta de larvas originales con su progenie. A priori, esto puede suponer un problema cuando se realizan infecciones y experimentos de supervivencia. Sin embargo, existen varias maneras de evitar el proceso de deposición de huevos. Por ejemplo, es muy común el uso la cepa mutante de *C. elegans glp4*, que es estéril a 25°C (29). Alternativamente, también es frecuente el uso de la droga fluorodeoxiuridina (FUDR), que causa esterilidad de las larvas al inhibir la eclosión de los huevos (39).

La viabilidad de las larvas puede evaluarse de diferentes maneras, siendo la observación microscópica directa la más utilizada y más fácil de realizar. El principal indicador de la muerte de las larvas es su falta de movilidad al tocarlas con la punta de un alambre. También existen equipamientos que son capaces de monitorizar de manera automática la movilidad de las larvas, aunque la disponibilidad de dichos equipos suele ser muy limitada para la gran mayoría de grupos de investigación.

Con todas estas consideraciones, son muy numerosos los trabajos en los que se ha utilizado *C. elegans* como modelo de huésped (ver ejemplos en 31-45).

Ventajas y desventajas del modelo de *C. elegans*

El modelo de *C. elegans* ofrece múltiples ventajas para investigar enfermedades infecciosas. En primer lugar, es un modelo fácil de obtener e implantar en el laboratorio, y no requiere equipamientos especiales para realizar infecciones y monitorización de la viabilidad. Su precio es muy barato y además es posible conservar los gusanos a -80°C, lo que hace que no sea necesario mantenerlos perpetuamente en el laboratorio y recuperarlos cuando sea necesario. Otra de las principales ventajas de *C. elegans* es la facilidad para realizar manipulaciones genéticas y de hecho, se dispone de una colección de mutantes para la gran mayoría de genes que pueden ser adquiridos a un precio muy razonable. Es un modelo óptimo para investigar la función de determinados componentes de la respuesta inmune frente a patógenos. También es un modelo adecuado para realizar ensayos a gran escala, ya que pueden cultivarse en placas multipocillo y así poder evaluar múltiples condiciones en paralelo. Por ello, es un modelo óptimo para evaluar la actividad de compuestos antimicrobianos (46).

La principal limitación de la experimentación con *C. elegans* es la imposibilidad de trabajar a altas temperaturas, ya que las larvas

no pueden incubarse a Tª superiores a 26-27°C. Por ello, no es posible evaluar virulencia a temperatura corporal humana. Además, la monitorización de la viabilidad puede ser un procedimiento tedioso, ya que implica la evaluación individual de múltiples gusanos en diferentes pocillos de manera microscópica. Por último, debido a la manera en la que se realizan las infecciones, no es posible controlar la dosis de patógeno que infecta a cada larva.

INSECTOS: *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Otro de los modelos ampliamente utilizados en investigación biomédica es *Drosophila melanogaster*, normalmente conocida como mosca del vinagre o mosca de la fruta. Este insecto se ha utilizado clásicamente en genética y es fácil de implantar y mantener en el laboratorio. El tamaño de la mosca adulta es pequeño (alrededor de 3 mm). Su ciclo de vida es similar al de *G. mellonella* (ver revisión en 47). Los huevos depositados por el resultado del cruce de machos y hembras eclosionan y dan lugar a un estado larvario que al cabo de unos 3-4 días se transforma en pupas, de las que aparecerán las moscas. Las moscas tienen una vida media de unos 3-4 meses.

Drosophila melanogaster ha sido utilizado como modelo de investigación durante el último siglo, especialmente desde que Morgan realizara los trabajos clásicos en este modelo demostrando que la heredabilidad genética se basaba en los cromosomas. Desde entonces se ha utilizado para investigar enfermedades infecciosas, inmunología, desarrollo, envejecimiento, cáncer y enfermedades neurodegenerativas.

Sistema inmune de *D. melanogaster*

El sistema inmune de *D. melanogaster* depende principalmente de respuestas innatas (ver revisiones en 48,49). Al igual que en *C. elegans*, las barreras exteriores juegan un papel primordial para evitar la adquisición de patógenos. En este sentido, *D. melanogaster* se ha usado como modelo para investigar la respuesta inmune del intestino, ya que esta estructura presenta similitud con el intestino de los vertebrados. En su interior, se aloja una microflora muy diversa y es un lugar expuesto a microorganismos que se adquieren por ingestión. La principal barrera que impide su entrada al lumen es la matriz peritrófica, que se alinea junto a las células epiteliales e impide la entrada de patógenos. Está compuesta por una gran variedad de proteínas con similitud a mucinas. En el control de la infección en el intestino, juega un papel muy importante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de AMPs. Las ROS se forman

gracias a la acción de dos tipos de enzimas: NADPH oxidasas (Nox, que producen peróxido de hidrógeno), y Dual oxidasas (Duox, que producen tanto peróxido de hidrógeno como ácido hipocloroso). La producción de ROS en el intestino se activa en respuesta a componentes de patógenos, como el péptidoglicano. Con respecto a los AMPs, su producción varía según la región del intestino y depende de rutas de señalización, siendo la principal la ruta Imd que, como se describirá a continuación, es una de las principales vías que regulan la inmunidad en *D. melanogaster* (ver representación esquemática y resumida en la Figura 6). Además, también presenta un sistema de reconocimiento y de respuesta frente a infecciones virales, que depende de rutas de MAPK (ERK; ver 50).

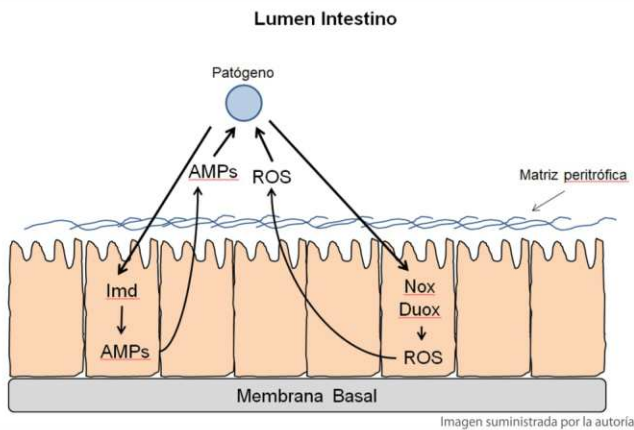


Figura 6.- Representación esquemática de los principales mecanismos de defensa frente a patógenos en el intestino de *D. melanogaster*.

Durante la infección sistémica, la respuesta celular depende principalmente de hemocitos, que son equivalentes a las células sanguíneas de vertebrados (51). Se han descrito tres clases de hemocitos: plasmatocitos (células fagocíticas), lamelocitos (que se encargan de la encapsulación de cuerpos exógenos) y células cristalinas (cuya función principal es la síntesis de melanina). Es de especial interés la investigación de la fagocitosis por parte de los hemocitos de *D. melanogaster*, ya que ha dado lugar al descubrimiento de receptores homólogos y parálogos en vertebrados. Además, existen líneas celulares de *D. melanogaster* que se pueden mantener fácilmente en el laboratorio.

La respuesta humoral se basa en la producción de melanina, ROS y AMPs. Al igual que en *G. mellonella*, la melanización es una de las primeras respuestas inducidas en respuesta a patógenos, y se usa para la encapsulación y secuestro de estos microorganismos. Con respecto a la producción de AMPs, se ha

descrito que en infecciones sistémicas se produce principalmente en el cuerpo gordo (equivalente al hígado) y depende de NF-κB.

En *D. melanogaster*, se han descrito dos rutas principales que regulan la respuesta inmune y producción de AMPs: La ruta Toll, y la ruta Imd (ver resumen en la Figura 7). La ruta Toll se activa principalmente en respuesta a hongos y bacterias Gram+, mientras que la ruta Imd se activa en presencia de Gram-. Los receptores Toll presentan una particularidad, ya que no se unen directamente a componentes de los microorganismos, sino a un ligando endógeno denominado Spätzle. Este factor funciona como una citoquina y se activa por proteólisis en respuesta a factores producidos por patógenos (como proteasas, pared fúngica y péptidoglicano). La activación de la ruta Toll produce principalmente el péptido drosomicina. La ruta Toll es activa principalmente en el cuerpo gordo.

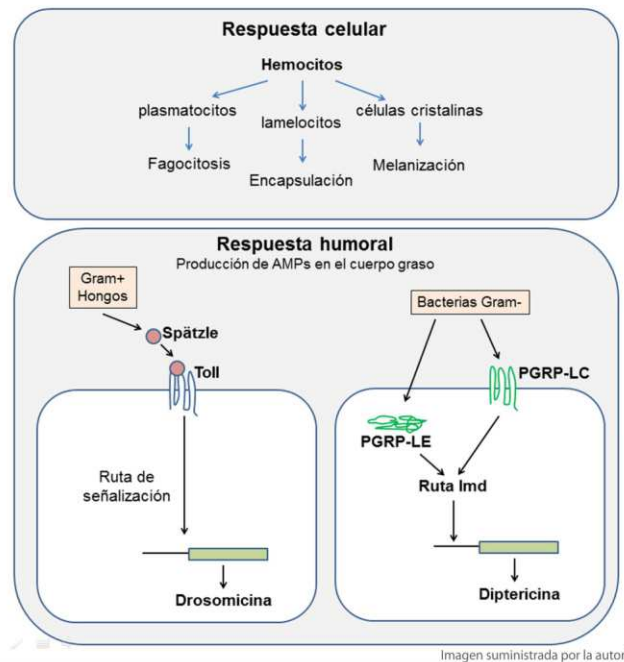


Figura 7.- Respuesta inmune sistémica de *D. melanogaster*.

A diferencia de la señalización por Toll, la respuesta Imd no depende de ningún ligando endógeno y se activa por unión directa a componentes producidos por patógenos, que son reconocidos por los receptores PGRP-LC (situados en la membrana) y PGRP-LE (intracelular). La activación de la vía Imd resulta principalmente en la producción del AMP diptericina. Además de ser activa en el cuerpo gordo, la ruta Imd también regula la respuesta inmune en el intestino (ver Figura 6).

Drosophila melanogaster también desarrolla respuestas inmunes específicas en la defensa frente a infecciones virales. En ellas, no sólo participan las vías Toll e Imd, sino que además participan respuestas que inducen RNAs de interferencia (RNAi) y que contribuyen a la destrucción del material genético de los virus (ver revisiones en 52,53).

Por último, la coagulación de la hemolinfa también participa en el control de partículas y microorganismos exógenos. Este proceso requiere componentes celulares y humorales, y contribuye al recubrimiento y contención de patógenos.

***Drosophila melanogaster* como huésped**

En el caso de las enfermedades infecciosas, el mejor ejemplo que ilustra su aplicabilidad fue el descubrimiento de los receptores Toll. En el trabajo original, los autores describieron como moscas carentes del gen *toll* eran más sensibles a la infección por *Aspergillus fumigatus*, demostrando por primera vez la función clave de este tipo de receptores en la respuesta inmune frente a determinados patógenos (54). Con posterioridad, esto también se demostró en mamíferos (*Toll-Like Receptors*). En consecuencia, podría concluirse que el descubrimiento de los TLR se realizó gracias al uso de *D. melanogaster* como modelo no convencional en la investigación patógeno-huésped.

En los modelos de infección, las moscas se pueden infectar de varias maneras. La más sencilla es mediante la ingestión del patógeno de interés, para lo que se permite que los insectos estén en contacto con cultivos del microorganismo. Además, también se pueden realizar infecciones sistémicas mediante microinyección, usando microjeringas capaces de inyectar volúmenes pequeños (alrededor de 50 nanolitros), o bien simplemente a través de un pinchazo con una aguja impregnada con el patógeno de interés.

En los últimos años, *D. melanogaster* se ha convertido en un modelo muy usado para investigar los mecanismos de infección causada por bacterias y hongos (ver ejemplos en 55-57), ya que es sencillo visualizar la viabilidad y sensibilidad de las moscas a patógenos. Además, la conservación de algunas partes de la respuesta innata lo convierte en un modelo óptimo para investigar el papel de elementos específicos del sistema inmune frente a la infección (como por ejemplo: receptores Toll, rutas de señalización de MAPKs, mecanismos de RNA de interferencia, etc.).

Ventajas y desventajas del modelo de *D. melanogaster*

El uso de *D. melanogaster* ofrece varias ventajas como modelo de huésped de infección. En primer lugar, existe una gran variedad de herramientas genéticas, con lo que es fácil manipular e investigar determinados componentes del sistema inmune. Además, se pueden manipular fácilmente ya que pueden anesthesiarse de múltiples maneras y, por lo tanto, manejarlas de manera individual. El modelo puede implantarse en prácticamente cualquier laboratorio ya que no se requieren equipamientos especiales ni formación especializada del personal encargado de su manipulación. Otra ventaja que ofrece *D. melanogaster* en comparación con *C. elegans* es que la visualización de la viabilidad es muy sencilla y no requiere de lupas o microscopios.

Al igual que en *C. elegans*, las principales limitaciones radican en la dosis administrada y en la temperatura de incubación. Debido a la manera en la que se realizan las infecciones, es difícil controlar la dosis exacta administrada a las moscas, lo que puede causar variaciones inter-individuo en los experimentos. La temperatura óptima de incubación de las moscas suele ser baja, con lo que no es recomendable realizar experimentos a temperatura corporal humana, ya que se produce un estrés que puede interferir con los resultados obtenidos. Por último, es un modelo menos adecuado que *G. mellonella* y *C. elegans* cuando se pretende evaluar la efectividad de compuestos antimicrobianos, ya que no es obvio estimar la dosis de fármaco que se administra a las moscas.

CONCLUSIONES Y DIRECCIONES FUTURAS

Las limitaciones bioéticas de los modelos vertebrados han llevado a la implantación de modelos alternativos para investigar enfermedades infecciosas. Su uso es cada vez más aceptado y ya son numerosas publicaciones en las que se aceptan modelos alternativos para investigar virulencia o de eficacia de antimicrobianos. Un beneficio de usar estos modelos es que es posible aumentar la N de los experimentos de manera significativa, con lo que se obtienen resultados estadísticos más robustos. Los mecanismos de respuesta inmune que desarrollan también están conservados y, en muchas ocasiones, se ha demostrado una correlación entre los resultados obtenidos con huéspedes alternativos y vertebrados como ratones. Por ello, estos modelos son actualmente una magnífica opción para realizar rastreos preliminares, usando una N alta y pudiendo realizar experimentos en cortos periodos de tiempo (entre 3-7 días), que ayudan a concretar y reducir el número de

experimentos a realizar en modelos de vertebrados. En la tabla 1 se resumen de manera muy esquemática las principales características de los modelos descritos.

Tabla 1.- Características de los modelos de *G. mellonella*, *C. elegans* y *D. melanogaster* como huéspedes en modelos de infección.

	<i>Galleria mellonella</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
Control inóculo	SI	NO	DIFÍCIL
Incubación a 37°C	SI	NO	NO
Precio	ASEQUIBLE	ASEQUIBLE	ASEQUIBLE
Visualización viabilidad	VISUAL	MICROSCÓPICA	VISUAL
Herramientas Genéticas	NO	SI	SI

La falta de experiencia acerca de la correlación de los resultados obtenidos en todos estos modelos con vertebrados hace que a día de hoy no sean una opción de reemplazo total de animales protegidos. Por ello, es necesario en el futuro afianzar su uso y acumular experiencia sobre las condiciones óptimas en las que su utilización ofrece una opción real de reemplazo. En cambio, las ventajas que ofrecen los modelos alternativos sí pueden ser una opción real para sustituir muchos ensayos realizados *in vitro*. También hay que considerar que la disponibilidad de modelos no sujetos a la legislación permite realizar una cantidad de experimentos no previstos, lo que permite ahondar en aquellos resultados inesperados, extraños o no reproducibles, difícil de realizar en vertebrados. Todo ello repercute en una ventaja, no sólo bioética sino científica para los grupos de investigación que los usan, ya que ofrecen una herramienta sencilla para aumentar su productividad.

El principal aspecto que cuestiona hasta qué punto los resultados obtenidos en modelos alternativos se correlacionan con los modelos de vertebrados es la ausencia de inmunidad adaptativa (linfocitos, producción de anticuerpos, citoquinas, etc.). Por ello, se están implantando también en los últimos años modelos de formas embrionarias de algunos vertebrados en un periodo de gestación temprano (previo al cual estarían regulados por la legislación vigente). Se están utilizando dos modelos: los huevos embrionados de pollo y los embriones de pez cebra. En particular, los embriones de pez cebra se están imponiendo como un modelo de investigación biomédica y ya existen artículos en los que se ha utilizado como huésped de infección. Su implantación y uso es laborioso y no es obvio para muchos laboratorios, ya que requiere de instalaciones específicas (acuarios) y experiencia en su manejo. Sin embargo, su gran potencial puede hacer que sea uno de los modelos de referencia

en el futuro en el campo de las enfermedades infecciosas. De todas maneras, aunque el pez cebra tienen una inmunidad más desarrollada que los nematodos y los insectos, hay que considerar que la inmunidad adaptativa no se desarrolla hasta los adultos, con lo que el uso de embriones (que no están protegidos por ley) también presenta la limitación de no poder evaluar la función de respuestas adaptativas.

Por último, en el contexto de la investigación biomédica actual, la búsqueda de alternativas a los modelos protegidos es una responsabilidad a adquirir por los investigadores, siempre y cuando el reemplazo sea posible. Además, también es necesario abrir el campo y evaluar los beneficios de nuevos posibles modelos alternativos que en la actualidad no se están usando. Por ejemplo, no pueden descartarse las plantas como huéspedes y que puedan también ofrecer modelos alternativos para investigar enfermedades infecciosas humanas, dado que muchos patógenos son ambientales y son capaces de producir enfermedades en plantas. La ampliación del repertorio de modelos no convencionales disponibles puede suponer también un gran beneficio científico, ya que permitiría involucrar a muchos más laboratorios en la investigación en Biomedicina.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Russell W.M.S. and Burch R.L. *The Principles of Humane Experimental Technique*. London: Methuen, 1959.
- 2) Glavis-Bloom J., Muhammed M., and Mylonakis E. *Of model hosts and man: using Caenorhabditis elegans, Drosophila melanogaster and Galleria mellonella as model hosts for infectious disease research*. *Adv Exp Med Biol*. 2012, 710:11-17.
- 3) Brunke S., Quintin J., Kasper L., et al. *Of mice, flies--and men? Comparing fungal infection models for large-scale screening efforts*. *Dis Model Mech*. 2015, 8:473-86.
- 4) Kwadha C.A., Ong'amo G.O., Ndegwa P.N., et al. *The Biology and Control of the Greater Wax Moth, Galleria mellonella*. *Insects*. 2017, 8(2):61.
- 5) Wojda I. *Immunity of the greater wax moth Galleria mellonella*. *Insect Sci*. 2017, 24:342-57.
- 6) Tsai C.J., Loh J.M., and Proft T. *Galleria mellonella infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing*. *Virulence*. 2016, 7:214-29.
- 7) Mylonakis E., Moreno R., El Khoury J.B., et al. *Galleria mellonella as a model system to study Cryptococcus neoformans pathogenesis*. *Infect Immun*. 2005, 73:3842-50.

- 8) Joyce S.A., and Gahan C.G. *Molecular pathogenesis of Listeria monocytogenes in the alternative model host Galleria mellonella*. Microbiology. 2010, 156:3456-68.
- 9) Peleg A.Y., Jara S., Monga D., et al. *Galleria mellonella as a model system to study Acinetobacter baumannii pathogenesis and therapeutics*. Antimicrob Agents Chemother. 2009, 53:2605-9.
- 10) Garcia-Rodas R., Casadevall A., Rodriguez-Tudela J.L., et al. *Cryptococcus neoformans capsular enlargement and cellular gigantism during Galleria mellonella infection*. PLoS One. 2011, 6:e24485.
- 11) Garcia-Solache M.A., Izquierdo-García D., Smith C., et al. *Fungal virulence in a lepidopteran model is an emergent property with deterministic features*. MBio. 2013, 4:e00100-13.
- 12) Mesa-Arango A.C., Forastiero A., Bernal-Martinez L., et al. *The non-mammalian host Galleria mellonella can be used to study the virulence of the fungal pathogen Candida tropicalis and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast*. Med Mycol. 2013, 51(5):461-72.
- 13) Scorzoni L., de Lucas M.P., Mesa-Arango A.C., et al. *Antifungal efficacy during Candida krusei infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile*. PLoS One. 2013, 8:e60047.
- 14) Forastiero A., Mesa-Arango A.C., Alastruey-Izquierdo A., et al. *Candida tropicalis antifungal cross-resistance is related to different azole target (Erg11p) modifications*. Antimicrob Agents Chemother. 2013, 57:4769-81.
- 15) Freitak D., Schmidtberg H., Dickel F., et al. *The maternal transfer of bacteria can mediate trans-generational immune priming in insects*. Virulence. 2014, 5:547-54.
- 16) Fuchs B.B., O'Brien E., Khoury J.B., et al. *Methods for using Galleria mellonella as a model host to study fungal pathogenesis*. Virulence. 2010, 1:475-82.
- 17) Jander G., Rahme L.G., and Ausubel F.M. *Positive correlation between virulence of Pseudomonas aeruginosa mutants in mice and insects*. J Bacteriol. 2000, 182:3843-5.
- 18) Trevijano-Contador N., Herrero-Fernandez I., Garcia-Barbazan I., et al. *Cryptococcus neoformans induces antimicrobial responses and behaves as a facultative intracellular pathogen in the non mammalian model Galleria mellonella*. Virulence. 2015, 6:66-74.
- 19) Cotter G., Doyle S., and Kavanagh K. *Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts*. FEMS Immunol Med Microbiol. 2000, 27:163-9.
- 20) Brennan M., Thomas D.Y., Whiteway M., et al. *Correlation between virulence of Candida albicans mutants in mice and Galleria mellonella larvae*. FEMS Immunol Med Microbiol. 2002, 34:153-7.
- 21) Maurer E., Browne N., Surlis C., et al. *Galleria mellonella as a host model to study Aspergillus terreus virulence and amphotericin B resistance*. Virulence. 2015, 6:591-8.
- 22) Desalermos A., Tan X., Muthiah R., et al. *A Multi-Host Approach for the Systematic Analysis of Virulence Factors in Cryptococcus neoformans*. J Infect Dis. 2015, 211(2):298-305.
- 23) Mukherjee K., Hain T., Fischer R., et al. *Brain infection and activation of neuronal repair mechanisms by the human pathogen Listeria monocytogenes in the lepidopteran model host Galleria mellonella*. Virulence. 2013, 4:324-32.
- 24) Nigon V.M. and Felix M.A. *History of research on C. elegans and other free-living nematodes as model organisms*. WormBook. 2017:1-91.
- 25) Goldstein B. *Sydney Brenner on the Genetics of Caenorhabditis elegans*. Genetics. 2016; 204:1-2.
26. Strange K. *An overview of C. elegans biology*. Methods Mol Biol. 2006, 351:1-11.
- 27) Schulenburg H. and Ewbank J.J. *The genetics of pathogen avoidance in Caenorhabditis elegans*. Mol Microbiol. 2007, 66:563-70.
- 28) Engelmann I. and Pujol N. *Innate immunity in C. elegans*. Adv Exp Med Biol. 2010, 708:105-21.
- 29) Beanan M.J. and Strome S. *Characterization of a germ-line proliferation mutation in C. elegans*. Development. 1992, 116:755-66.
- 30) Mitchell D.H., Stiles J.W., Santelli J., et al. *Synchronous growth and aging of Caenorhabditis elegans in the presence of fluorodeoxyuridine*. J Gerontol. 1979, 34: 28-36.
- 31) La Rosa S.L., Snipen L.G., Murray B.E., et al. *A genomic virulence reference map of Enterococcus faecalis reveals an important contribution of phage03-like elements in nosocomial genetic lineages to pathogenicity in a Caenorhabditis elegans infection model*. Infect Immun. 2015, 83:2156-67.
- 32) Fung C.C., Octavia S., Mooney A.M., et al. *Virulence variations in Shigella and enteroinvasive Escherichia coli using the Caenorhabditis elegans model*. FEMS Microbiol Lett. 2015, 362:1-5.
- 33) Gerbaba T.K., Gupta P., Rioux K., et al. *Giardia duodenalis-induced alterations of commensal bacteria kill Caenorhabditis elegans: a new model to study microbial-microbial interactions in the gut*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2015, 308:G550-561.
- 34) Desalermos A., Tan X., Rajamuthiah R., et al. *A multi-host approach for the systematic analysis of virulence factors in Cryptococcus neoformans*. J Infect Dis. 2015, 211:298-305.
- 35) Kong C., Yehye W.A., Abd Rahman N., et al. *Discovery of potential anti-infectives against Staphylococcus aureus using a Caenorhabditis elegans infection model*. BMC Complement Altern Med. 2014, 14:4.
- 36) Utari P.D. and Quax W.J. *Caenorhabditis elegans reveals novel Pseudomonas aeruginosa virulence mechanism*. Trends Microbiol. 2013, 21:315-6.
- 37) Balla K.M. and Troemel E.R. *Caenorhabditis elegans as a model for intracellular pathogen infection*. Cell Microbiol. 2013, 15: 1313-22.

- 38) Brassinga A.K. and Sifri C.D. *The Caenorhabditis elegans model of Legionella infection*. Methods Mol Biol. 2013, 954:439-61.
- 39) Muhammed M., Coleman J.J., and Mylonakis E. *Caenorhabditis elegans: a nematode infection model for pathogenic fungi*. Methods Mol Biol. 2012, 845:447-54.
- 40) Marsh E.K. and May R.C. *Caenorhabditis elegans, a model organism for investigating immunity*. Appl Environ Microbiol. 2012, 78:2075-81.
- 41) Niu Q., Huang X., Zhang L., et al. *A Trojan horse mechanism of bacterial pathogenesis against nematodes*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010, 107:16631-6.
- 42) Irazoqui J.E., Troemel E.R., Feinbaum R.L., et al. *Distinct pathogenesis and host responses during infection of C. elegans by P. aeruginosa and S. aureus*. PLoS Pathog. 2010, 6:e1000982.
- 43) Wu K., Conly J., McClure J.A., et al. *Caenorhabditis elegans as a host model for community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect. 2010, 16:245-54.
- 44) Tang R.J., Breger J., Idrum A., et al. *Cryptococcus neoformans gene involved in mammalian pathogenesis identified by a Caenorhabditis elegans progeny-based approach*. Infect Immun. 2005, 73:8219-25.
- 45) Mylonakis E., Ausubel F.M., Perfect J.R., et al. *Killing of Caenorhabditis elegans by Cryptococcus neoformans as a model of yeast pathogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002, 99:15675-80.
- 46) Kim W., Hendricks G.L., Lee K., et al. *An update on the use of C. elegans for preclinical drug discovery: screening and identifying anti-infective drugs*. Expert Opin Drug Discov. 2017, 12:625-33.
- 47) Jennings B.H. *Drosophila – a versatile model in biology & medicine*. Materialstoday. 2011, 14:190-5.
- 48) Kounatidis I. and Ligoxygakis P. *Drosophila as a model system to unravel the layers of innate immunity to infection*. Open Biol. 2012, 2:120075.
- 49) Buchon N., Silverman N., and Cherry S. *Immunity in Drosophila melanogaster—from microbial recognition to whole-organism physiology*. Nat Rev Immunol. 2014, 14:796-810.
- 50) Xu J., Hopkins K., Sabin L., et al. *ERK signaling couples nutrient status to antiviral defense in the insect gut*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013, 110:15025-30.
- 51) Vlisidou I. and Wood W. *Drosophila blood cells and their role in immune responses*. FEBS J. 2015, 282:1368-82.
- 52) Mussabekova A., Daeffler L., and Imler J.L. *Innate and intrinsic antiviral immunity in Drosophila*. Cell Mol Life Sci. 2017, 74:2039-54.
- 53) Xu J. and Cherry S. *Viruses and antiviral immunity in Drosophila*. Dev Comp Immunol. 2014, 42:67-84.
- 54) Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., et al. *The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults*. Cell. 1996, 86:973-83.
- 55) Vanhove A.S., Hang S., Vijayakumar V., et al. *Vibrio cholerae ensures function of host proteins required for virulence through consumption of luminal methionine sulfoxide*. PLoS Pathog. 2017, 13:e1006428.
- 56) Needham A.J., Kibart M., Crossley H., et al. *Drosophila melanogaster as a model host for Staphylococcus aureus infection*. Microbiology. 2004, 150:2347-55.
- 57) Botham C.M., Wandler A.M., and Guillemin K. *A transgenic Drosophila model demonstrates that the Helicobacter pylori CagA protein functions as a eukaryotic Gab adaptor*. PLoS Pathog. 2008, 4:e1000064.
- 58) Nehme N.T., Liegeois S., Kele B., et al. *A model of bacterial intestinal infections in Drosophila melanogaster*. PLoS Pathog. 2007, 3:e1173.
- 59) Vonkavaara M., Telepnev M.V., Ryden P., et al. *Drosophila melanogaster as a model for elucidating the pathogenicity of Francisella tularensis*. Cell Microbiol. 2008, 10:1327-38.
- 60) Apidianakis Y. and Rahme L.G. *Drosophila melanogaster as a model host for studying Pseudomonas aeruginosa infection*. Nat Protoc. 2009, 4:1285-94.
- 61) Chamilos G., Nobile C.J., Bruno V.M., et al. *Candida albicans Cas5, a regulator of cell wall integrity, is required for virulence in murine and toll mutant fly models*. J Infect Dis. 2009, 200:152-7.
- 62) Stroschein-Stevenson S.L., Foley E., O'Farrell P.H., et al. *Phagocytosis of Candida albicans by RNAi-treated Drosophila S2 cells*. Methods Mol Biol. 2009, 470:347-58.
- 63) Chamilos G., Lewis R.E., Hu J., et al. *Drosophila melanogaster as a model host to dissect the immunopathogenesis of zygomycosis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008, 105:9367-72.
- 64) Chamilos G., Samonis G., and Kontoyiannis D.P. *Drosophila melanogaster as a model host for the study of microbial pathogenicity and the discovery of novel antimicrobial compounds*. Curr Pharm Des. 2011, 17:1246-53.
- 65) Limmer S., Quintin J., Hetru C., et al. *Virulence on the fly: Drosophila melanogaster as a model genetic organism to decipher host-pathogen interactions*. Curr Drug Targets. 2011, 12:978-99.
- 66) Lionakis M.S. and Kontoyiannis D.P. *The growing promise of Toll-deficient Drosophila melanogaster as a model for studying Aspergillus pathogenesis and treatment*. Virulence. 2010, 1:488-99.
- 67) Hughes T.T., Allen A.L., Bardin J.E., et al. *Drosophila as a genetic model for studying pathogenic human viruses*. Virology. 2012, 423:1-5.



Su Colaborador para el Cuidado del Animal de Laboratorio

- Gama Completa
- Innovación Continua

Lechos

Enriquecimiento

Dietas



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®

RETTENMAIER IBÉRICA
S.L. Y CIA. S. COM.



Fibras diseñadas
por la naturaleza
Una compañía del grupo JRS

Travesera de Gracia 56, 2^o
08006 Barcelona

► ¡ Póngase en contacto
con nuestros expertos !

info@jrsiberica.com • Tel: 933 262 888

Tinciones histoquímicas de utilidad en experimentación animal

Ana Isabel Nieto Ruiz de Zárate

Unidad de Experimentación Animal. Universidad de Granada Anapath. Laboratorio de Anatomía Patológica. Granada.

INTRODUCCIÓN

En muchos proyectos con animales de experimentación, la histología es la pieza clave para determinar si los resultados de nuestro experimento son los que esperábamos o no. La tinción es el último paso de los 5 que constituyen el tratamiento convencional de un tejido antes de su observación al microscopio. A veces, con una tinción clásica de hematoxilina-eosina es suficiente para llegar al diagnóstico de una patología, pero en otras ocasiones, a ésta, hay que sumarle alguna otra que nos permita poner en evidencia componentes de ese tejido que puedan indicar una alteración. El desarrollo de la inmunohistoquímica nos ha permitido el uso de anticuerpos específicos para marcar antígenos en animales de experimentación de forma precisa, pero no debemos olvidar por ello los métodos convencionales de tinción, que resultan muy útiles en determinados casos y suelen resultar más económicos. Por otro lado, muchas de las tinciones clásicas se siguen usando hoy en día, otras se han visto reemplazadas y algunas se han abandonado debido al uso de reactivos que resultaron ser muy tóxicos para su manipulación.

Pero previamente a la tinción, es necesario señalar que una buena fijación de los tejidos es la base de una tinción correcta. La selección del fijador y la duración según el tipo de tejido pueden influir directamente sobre la capacidad de marcar un compuesto. Por otro lado, un procesado incorrecto puede hacer inviable una determinada tinción. Por ejemplo, no podremos fijar ni procesar una muestra con alcohol si queremos luego teñir lípidos ya que éstos se habrán disuelto. Debemos, por tanto, fijar con un compuesto no alcohólico y utilizar la congelación para preservar la muestra, realizando los cortes directamente en el tejido congelado.

Tras la fijación, el procesado, la inclusión en parafina y la

sección mediante un micrótopo o criotomo, la tinción con distintos compuestos químicos permite el estudio de órganos y tejidos, y su composición.

En esta pequeña revisión, hemos intentado dar una visión muy general de algunas tinciones convencionales que pueden ser una opción previa a la realización de una técnica de inmunohistoquímica. Hemos tratado también de incluir con cada tinción, un ejemplo de su uso en algunas patologías cuyos modelos animales ya se están utilizando.

CLASIFICACIÓN DE LAS TINCIONES Y LOS COLORANTES

Los tipos de tinciones pueden clasificarse en:

- Progresiva. Se deja el tejido en el colorante hasta conseguir la intensidad de coloración deseada.
- Regresiva. El tejido es teñido y decolorado sucesivamente usando diferentes soluciones.
- Directa. El colorante se combina directamente con los componentes celulares (por Ej., azul de toluidina).
- Contratinción. Dos colorantes son aplicados consecutivamente con un lavado o decoloración entre ambos (por Ej., hematoxilina-eosina).

Según el tipo de colorantes, se pueden clasificar en:

- a) Colorantes ácidos. Son ácidos orgánicos que se combinan con un metal, se disuelven en agua o alcohol y tienden a teñir el citoplasma. Reaccionan con los compuestos catiónicos (acidófilos) de las células como los grupos fosfatos, grupos sulfatos de los glucosaminoglicanos y carboxilos de las proteínas. Son la mayoría de los componentes del citoplasma (por Ej., eosina que tiñe de rosa el citoplasma).

b) *Colorantes básicos*. Son bases orgánicas combinadas con un radical clorhídrico o sulfato. Reaccionan con los compuestos aniónicos (basofílicos) de las células como los ácidos nucleicos y por eso tiñen los núcleos (por Ej., hematoxilina que, aunque no es exactamente un colorante básico, al contener sales de aluminio, éstas actúan como mordiente y permiten la unión del colorante a las estructuras basofílicas como los núcleos y el RNA del citoplasma, dándoles una tinción azul/púrpura. También tiñe de ese mismo color los carbohidratos del cartílago).

En la Tabla 1 se recogen ejemplos de cada tipo de colorante.

Tabla 1.- Ejemplos de colorantes ácidos y básicos.

Colorantes ácidos	
Fuschina ácida	Rojo
Azul anilina	Azul
Eosina	Rojo
Orange G	Naranja
Colorantes básicos	
Verde metilo	Verde
Azul metileno	Azul
Pironina G	Rojo
Azul de toluidina	Azul

TIPOS DE TINCIONES

El objetivo de esta revisión es ofrecer una visión general de los tipos de tinciones clásicas más habituales (excluyendo la inmunohistoquímica) que pueden ser empleadas en proyectos de investigación llevados a cabo con modelos animales. Se han seleccionado algunas de las más habituales, aunque es necesario señalar que existen muchas más. No se han incluido los protocolos de tinción, que aparecen ampliamente descritos en numerosas publicaciones y páginas webs, así como en la información proporcionada por las casas comerciales, ya que muchos de ellos están en forma de *kits* de tinción. En la revisión bibliográfica sí se incluyen algunos de los manuales y páginas más habituales (1,2). Un resumen de los resultados de las tinciones se recoge en la Tabla 2.

Tabla 2.- Resumen de los resultados de tinciones.

TINCIONES PARA EL TEJIDO CONJUNTIVO	
Tricrómico de Masson-Goldner	Colágeno: azul o verde Tejido muscular, fibrina, queratina: rojo Núcleos: negros
Tricrómico Van Gieson	Colágeno: rojo Músculo: amarillo Núcleos: negro azulado
Tricrómico de Gomori	Músculo: azul Fibras rojas rasgadas: rojo Colágeno intestinal: verde Núcleos: rojo púrpura
Técnica COX	Mitocondrias: acúmulos de color marrón
Rojo sirio	Colágeno: rojo Músculo: amarillo Núcleos: negro Luz polarizada: - Colágeno tipo I: anaranjado - Colágeno tipo III: verde
Impregnación sales de plata	Colágeno: amarillo Fibras reticulares: negro Tejido conjuntivo: marrón
Tinción de Verhoeff (T. Van Gieson)	Fibras elásticas: negro Colágeno: rojo Músculo: amarillo
Orceina ácida	Fibras elásticas: rojo oscuro Resto: anaranjado Antígenos hepatitis: rojo
Azul de toluidina	Gránulos histamina de mastocitos: púrpura Resto: azul
Safranina O-fast green	Cartilago articular: rojo Núcleos: azul Resto: verde
TINCIONES PARA SUSTANCIAS DE ACÚMULO	
Ácido periódico de Schiff (PAS)	Sustancias PAS +: rosa-magenta - Glucógeno, glicoproteínas, mucopolisacáridos - Pared de hongos Núcleos: azul
Oil red	Lípidos: rojo Núcleos: azul
Rojo congo	Sustancia amiloide: rosa - Luz polarizada: verde Núcleos: azul
PIGMENTOS	
Tinción Masson-Fontana	Melanina: negra Núcleos: rojo Resto: rosa
Azul perls Prusia	Hierro: azul Núcleos: rojo Citoplasma: rosa
Rodamina	Cobre: anaranjado Núcleos: azules
TINCIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO	
Luxol fast blue	Mielina: azul Neuronas y núcleos cel. Gliales: rosa Sustancia de Nissl: rosa pálido

Tinción para el tejido conjuntivo

El tejido conjuntivo tiene como función principal conectar y dar soporte a otros tipos de tejidos del organismo. Además, sirve

Tinciones y tejidos

de medio para el paso de metabolitos y como depósito de lípidos, agua y electrolitos. Por otro lado, es el tejido que suele reemplazar a aquellos con escasa capacidad de regeneración cuando éstos sufren una lesión. Está formado por células, fibras y una matriz extracelular amorfa (ambas producidas por las células).

Existen diferentes tinciones para distinguir los distintos componentes del tejido conjuntivo y de ellas, una de las más usadas es la tinción de **tricrómico de Masson-Goldner**. Los núcleos se tiñen de azul oscuro, el músculo y la queratina de rojo y el tejido conjuntivo depende del tipo del colorante empleado. Si se usa como colorante el azul de anilina, aparecerá de este color (ver Figura 1A). Otra variante es usar el verde luz en lugar de azul de anilina y el tejido conjuntivo se teñirá entonces de verde (ver Figura 1B).

Esta tinción sirve, por tanto, para diferenciar entre colágeno y músculo, así como identificar algunas estructuras como cápsulas de órganos, lámina propia de tracto gastrointestinal o estructuras bronco-vasculares del pulmón. También es una técnica valiosa en determinados procesos patológicos como cirrosis en hígado o fibrosis tras un infarto de miocardio, fibrosis glomerulares en patologías renales y la queratina en alteraciones de la piel.

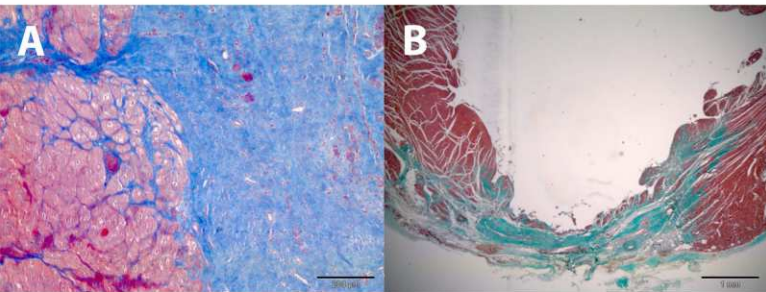


Figura 1.-Tricrómico de Masson-Goldner. Musculo cardiaco con fibrosis teñido con tricrómico de Masson-Goldner con azul de anilina (A) o con verde luz (B).

El **tricrómico de Van Gieson**, nos permiten diferenciar también el colágeno del músculo y las aplicaciones son las mismas que para el tricrómico de Masson-Goldner. En este caso, el colágeno se tiñe de color rojo como consecuencia de su afinidad por la picrofucsina (resultado de la unión de la fucsina ácida con el ácido pícrico). El músculo y el estrato córneo de la piel lo hacen de amarillo. Combinado con la técnica de Verhoeff o Weigert, las fibras elásticas se tiñen de negro.

El **tricrómico de Gomori** (ver Figura 2A), además de las aplicaciones del resto de los tricrómicos, nos permite visualizar las fibras rojas rasgadas (*ragged-red fibers*) en biopsias de músculo, que son el resultado de la acumulación de mitocondrias anormales bajo la membrana de la fibra muscular, características de determinadas patologías mitocondriales (3). Los cortes deben ser realizados en congelación. Otro método de marcar mitocondrias en cortes en congelación es mediante la **técnica de COX** (ver Figura 2B). Este es un componente de la cadena respiratoria y basándose en la oxidación de la diaminobencidina como donante de electrones al citocromo C, da lugar a la concentración de pigmentos marrones que se corresponden con la distribución de las mitocondrias en el tejido (4).

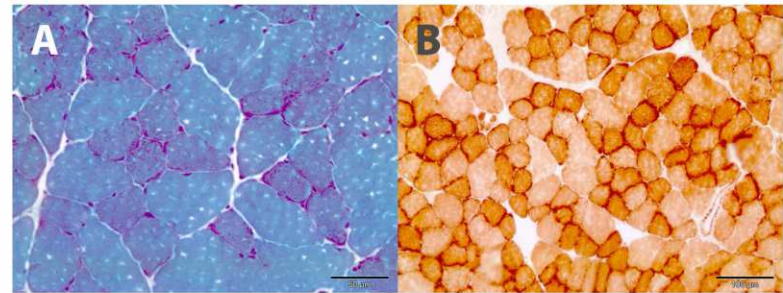


Imagen suministrada por la autoría

Figura 2.-A: Tricrómico de Gomori. La acumulación de mitocondrias subsarcoplásmicas aparece en rojo. B: Tinción de COX en músculo. El color marrón más intenso indica una acumulación de mitocondrias en la fibra muscular.

Tinción del componente fibroso

El componente fibroso de la matriz extracelular está formado principalmente por colágeno, las fibras elásticas y las glicoproteínas. El colágeno tipo I representa el 90% del colágeno presente en el tejido conectivo, huesos, piel y tendones. El colágeno tipo III da lugar a las fibras de reticulina que forman parte de la cápsula de los órganos como el hígado o en la médula ósea, así como en piel y músculo liso.

Para teñir el colágeno I y III se puede utilizar la técnica de rojo sirio. Con un microscopio óptico normal, el colágeno se teñirá de rojo mientras que el músculo lo hará de amarillo. Pero, además, bajo una luz polarizada, el colágeno tipo I será anaranjado y el tipo III verde, ambos refringentes.

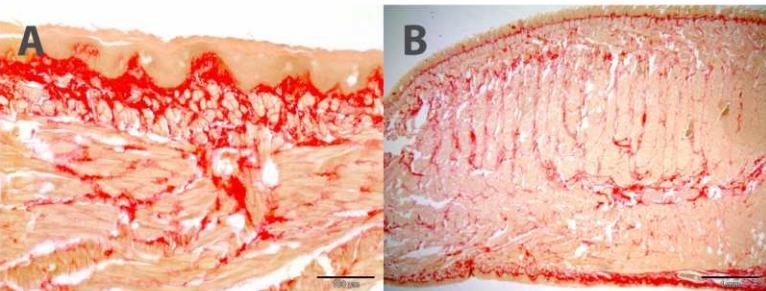


Imagen suministrada por la autoría

Figura 3.- Rojo sirio. **A:** Piel de rata. **B:** Lengua de rata.

Una forma de teñir específicamente las fibras de reticulina es con técnicas consistentes en una **impregnación de sales de plata**. La capacidad argirófila de las fibras de reticulina hace que las sales de plata se unan a ellas, reduciéndolas y dándoles un color negro característico. Estas fibras reticulares se encuentran en la cápsula del hígado, ganglios linfoides y pared de los vasos, y sus alteraciones se relacionan con enfermedades linfoproliferativas y roturas vasculares (5).

Por último, las fibras elásticas son las predominantes en las paredes vasculares, sobre todo aorta y arterias elásticas. Para su tinción se puede utilizar la técnica ya comentada de Verhoeff combinada con el tricrómico de Van Giesson. **La tinción de Verhoeff** tiñe gracias a una hematoxilina férrica, las fibras elásticas de forma selectiva de color negro. Si la combinamos con el tricrómico de Van Giesson, además el colágeno se teñirá de rojo y el músculo de amarillo. Otra técnica es la de la **orceina ácida** que permite, además de una tinción de color rojo oscuro de las fibras elásticas, visualizar del mismo color los antígenos de superficie de la hepatitis B, aunque esto hay que chequearlo posteriormente con una inmunohistoquímica (6).

Existen numerosas enfermedades genéticas asociadas a alteraciones de las fibras elásticas que provocan desde elastosis en la dermis a enfisema pulmonar o alteraciones vasculares (7).

Tinción del componente celular

Dentro de las células que componen el tejido conjuntivo, los mastocitos aparecen ampliamente distribuidos a lo largo de éste. Tintorialmente presentan una característica que los hace diferenciados: la metacromasia. Ésta es un cambio de color del colorante **azul de toluidina** al entrar en contacto con los gránulos de histamina del citoplasma de los mastocitos. Así, éstos se tiñen de rojo, siendo entonces claramente visibles.

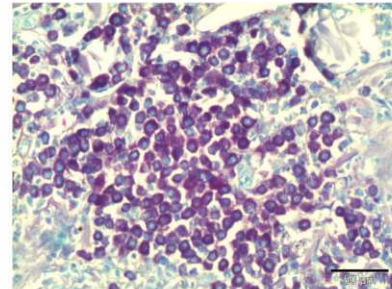


Imagen suministrada por la autoría

Figura 4.- Azul de toluidina. Acúmulo de mastocitos con metacromasia en una dermis.

Existen diferentes enfermedades en las que están implicados los mastocitos, desde procesos de alergias y anafilaxia, parasitosis, síndromes específicos o neoplasias (8).

Tinción para cartílago

La **safranina O** es un colorante básico que tiñe el cartílago de crecimiento y el cartílago articular (proteoglicanos, condrocitos y colágeno tipo II) de varios grados de rojo. Su intensidad es proporcional al contenido de proteoglicanos del cartílago. Con el **fast Green** se contratiñe de verde el resto, con lo que se mejora la diferenciación.

Se utiliza para la observación de la plataforma de crecimiento del cartílago, ya que la safranina tiñe el cartílago de rojo mientras que el resto del tejido conjuntivo y el hueso se tiñen de verde. La safranina también se emplea para el marcaje selectivo de la mucina y los gránulos de los mastocitos. Esta técnica es muy usada para poner en evidencia enfermedades articulares y pérdida del cartílago en artritis, por ejemplo, en los modelos en los que se usa el coadyuvante de Freud para inducir esta patología y su posterior resolución mediante tratamientos (9).

Como normalmente se utiliza en tejidos que requieren descalcificación, se recomienda el uso de descalcificadores que no contengan EDTA, ácido nítrico o ácido hidroclorehídrico, ya que éstos pueden extraer los proteoglicanos del tejido y disminuir la intensidad de la tinción.

Tinciones y tejidos

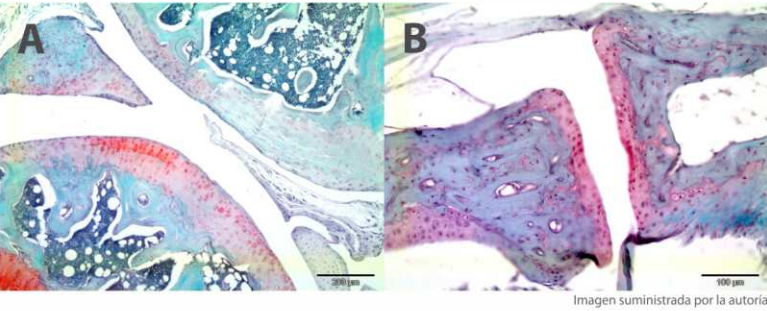


Figura 5.-Safranina O-fast Green. El cartilago se tiñe de rojo por la presencia de proteoglicanos y el hueso lo hace de verde. **A:** Rodilla de rata sin lesiones. **B:** Articulación del tarso en rata, también sin lesiones.

Tinción para sustancias de acúmulo

La tinción de **ácido periódico de Schiff (PAS)** se ha utilizado tradicionalmente para evidenciar la presencia de macromoléculas de hidratos de carbono, glicógeno o glicoproteínas en diferentes órganos o estructuras (ver Figuras 6 y 7). Así por ejemplo, permite valorar un incremento en el acúmulo de glucógeno presente en el hígado o en otros órganos en determinados trastornos del almacenamiento (10).

Por otro lado, al teñir la mucina de las células caliciformes de rosa intenso, permite una mejor valoración de un incremento de éstas en los epitelios en los que están presentes como el intestinal o el respiratorio. Así mismo, tiñe las membranas basales, lo que permite reconocer el engrosamiento de las mismas, como por ejemplo en las glomerulonefritis membranoproliferativas (11).

Por último, mediante esta tinción, las paredes de los hongos también se tiñen de rosa intenso, con lo que es posible reconocer una infección por ejemplo por candidiasis oral o vaginal.

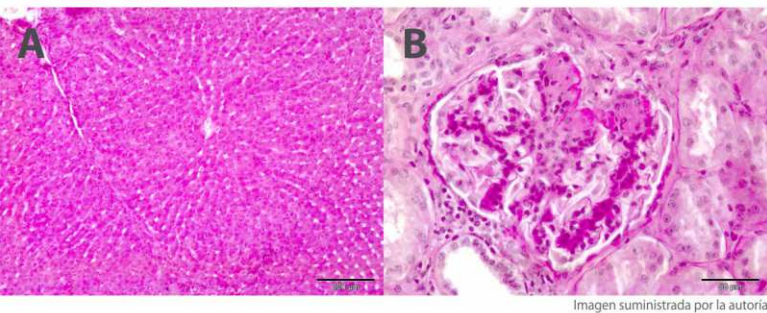


Figura 6.-Ácido Periódico de Schiff (PAS). **A:** Hígado con acúmulos de glucógeno en cerdo. **B:** Glomerulonefritis membranoproliferativa en riñón de ratón.

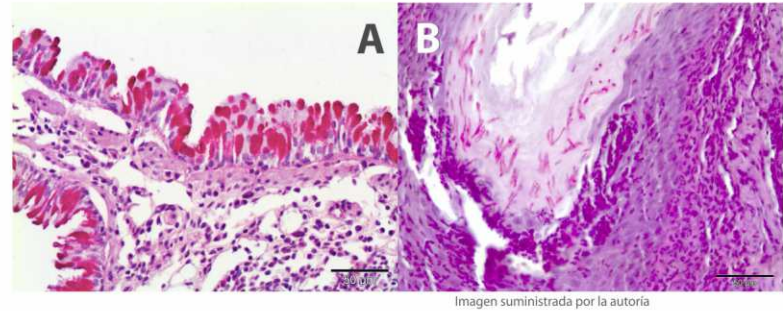


Figura 7.-Ácido periódico de Schiff. **A:** Pulmón de ratón con las células caliciformes bronquiales positivas a PAS. **B:** Vagina de ratón con una candidiasis.

En cuanto a la tinción de los lípidos, se utiliza el **oil red** en tejidos que pueden estar fijados en formaldehído (es necesario lavar posteriormente con agua corriente) o en fresco. Los cortes, como se ha comentado, deben ser realizados en congelación, sin procesado y el montaje final de las muestras debe ser acuoso. De esta manera, la grasa se mantendrá en la muestra y se teñirá de rojo-anaranjado y los núcleos de azul (ver Figura 8). La presencia de lípidos en órganos, como por ejemplo el hígado, es muy frecuente en distintos procesos patológicos como las esteatohepatitis no alcohólicas para las que ya existen modelos animales. El uso de una tinción como el oil red puede ayudar a valorar una disminución de los lípidos tras los diferentes tratamientos.

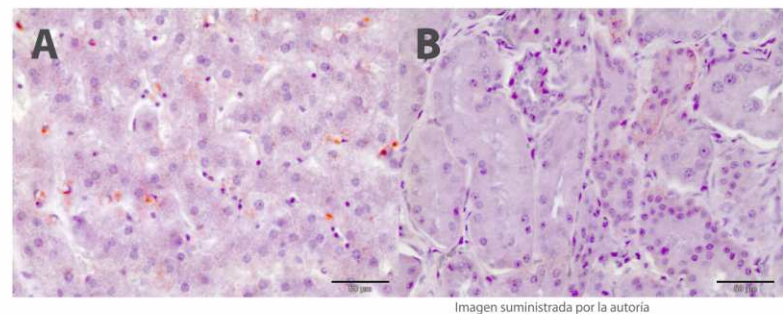


Figura 8.-Oil red en hígado (A) y riñón (B) de cerdo. Los lípidos aparecen teñidos de color anaranjado.

La sustancia amiloide es un material extracelular de naturaleza proteica, insoluble y resistente a la proteólisis. Debido a su estructura química, que generalmente se organiza en forma de láminas β , adquiere birrefringencia de color verde manzana cuando se utiliza la tinción de **rojo congo** al ser expuesta a la luz polarizada. Esta característica es independiente de su naturaleza proteica y por tanto, es común para la mayoría de los distintos tipos de amiloidosis.

El diagnóstico de las enfermedades que tienen en común el acúmulo de sustancia amiloide se hace mediante una biopsia de los órganos normalmente afectados como piel, riñón o hígado y su tinción con rojo congo. Entre estas enfermedades están algunas tan prevalentes y graves como diabetes tipo 2, Alzheimer, Parkinson o Huntington, cuyos modelos animales están actualmente usándose. Un ejemplo son los distintos tratamientos empleados para disminuir las placas de β amiloide provocadas en el cerebro de ratones modelos de Alzheimer (12).

Pigmentos y minerales

Los depósitos de diferentes pigmentos y minerales son también frecuentes en procesos patológicos. Los pigmentos no necesitan el uso de técnicas de tinción especiales para su identificación, ya que por sí mismos cuentan con características tintoriales que los distinguen. Así por ejemplo, la melanina, aunque se puede teñir con una **tinción de Masson Fontana**, también se tiñe de color marrón oscuro con la hematoxilina-eosina. Igualmente, los compuestos derivados de la hemoglobina como la hemosiderina se observan de color anaranjado con esta tinción.

Pero si queremos identificar por ejemplo el ion de hierro en hígado con esteatosis hepática, se puede usar la técnica de **azul perls Prusia** para hacer una valoración de los depósitos de este mineral en el órgano. Estos depósitos aparecen de color azul brillante, mientras que los núcleos y los citoplasmas celulares lo hacen en rojo y rosa, respectivamente. También es útil en enfermedades como la hemocromatosis, que cursa en modelos de ratón con depósitos de hierro en hígado, páncreas y corazón, pero no se encuentra en los macrófagos (13).

En cuanto al cobre, se puede marcar mediante una tinción de **rodamina**, apareciendo teñido de color naranja sobre un fondo azul. Se suele usar para determinar la presencia de este metal en patologías que cursan con depósitos de cobre en tejidos como la enfermedad de Wilson, una patología de origen genético para la que ya existen modelos en ratones con esta misma acumulación de cobre (14).

Tinción del Sistema Nervioso

Algunas de las tinciones más empleadas en el sistema nervioso son el **Luxol Fast Blue** y la **tinción de Nissl**. En la primera, el colorante se fija a las lipoproteínas de las bandas de mielina y las tiñe de color azul turquesa (ver Figura 9). Las neuronas y los núcleos de las células gliales aparecen de color rosa y la sustancia

de Nissl de color rosa más pálido. Se puede contrateñir con violeta de cresilo, nitrato de plata o hematoxilina. La tinción es lenta y requiere al menos una noche a 37°C y una diferenciación con carbonato de litio.

La falta de mielina en el sistema nervioso central se asocia por ejemplo a traumatismos del cerebro, una degeneración de la sustancia blanca, esclerosis múltiple o incluso a procesos de envejecimiento (15).

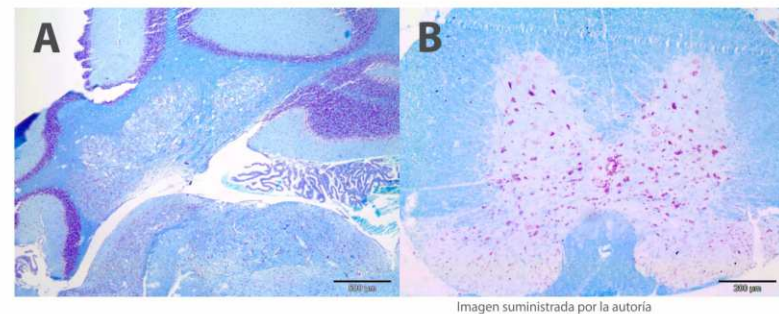


Figura 9.-Luxol fast blue. A: Cerebelo de ratón con áreas de desmielinización. **B:** Médula ósea de ratón sin alteraciones.

CONCLUSIONES

Además de las técnicas de inmunohistoquímica, algunas técnicas convencionales de tinción pueden aportarnos una información valiosa cuando queremos comprobar los resultados de nuestros estudios en los tejidos. Por ello, debemos tenerlas en cuenta y considerarlas como una opción y en ocasiones, más económica.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) <https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/protocolos/listado.php>
- 2) <http://www.nottingham.ac.uk/pathology/protocols/masstri.html>
- 3) <http://neuromuscular.wustl.edu/pathol/histol/trichrom.htm>
- 4) Tanji K. and Bonilla E. *Light microscopic methods to visualize mitochondria on tissue sections*. Methods. 2008, 46:274-80.
- 5) Grond-Ginsbach C., Schnippering H., Hausser I., et al. *Ultrastructural connective tissue aberrations in patients with intracranial aneurysms*. Stroke. 2002, 33(9):2192-6.
- 6) Dettmeyer R.B. *Staining techniques and microscopy*. In Dettmeyer R. *Forensic histopathology: Fundamental and Perspectives*. Springer. 2011, 17-35.

Tinciones y tejidos

- 7) Baldwin A.K., Simpson A., Steer R., et al. *Elastic fibres in health and disease*. Expert Rev Mol Med. 2013, 15:1-30.
- 8) DeBruin E.J., Gold M., Lo B.C., et al. *Mast cells in human health and disease*. Methods Mol Biol. 2015, 1220:93-119.
- 9) Schmitz N., Lavery S., Kraus V.B., et al. *Basic methods in histopathology of joint tissues*. Osteoarthritis Cartilage. 2010, 18 (Suppl 3):S113-6.
- 10) Bali D.S., Chen Y.T., Austin S., et al. *Glycogen Storage Disease Type I*. In Pagon R.A. et al. Gene Reviews [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle. 2016.
- 11) Sethi S. and Fervenza F.C. *Membranoproliferative Glomerulonephritis: Pathogenetic heterogeneity and proposal for a new classification*. Seminars in Nephrology. 2011, 31(4):341-8.
- 12) Haass C. and Selkoe D.J. *Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide*. Nature Review. 2007, 8:101-12.
- 13) Huang F.W., Pinkus J.L., Pinkus G.S., et al. *A mouse model of juvenile hemochromatosis*. J Clin Invest. 2005, 115(8):2187-91.
- 14) Lutsenko S. *Atp7b $-/-$ mice as a model for studies of Wilson's disease*. Biochemical Society Transactions. 2008, 36(6):1233-8.
- 15) Gibson-Corley K.N., Boyden A.W., Leidinger M.R., et al. *A method for histopathological study of the multifocal nature of spinal cord lesions in murine experimental autoimmune encephalomyelitis*. PeerJ. 2016, 4:e1600.

HÁGASE SOCIO BENEFACTOR
SU EMPRESA TAMBIÉN PUEDE SER PARTE DE LA SECAL

ESTAMOS
EN EL CENTRO DE
LA INVESTIGACIÓN
EN HABLA
HISPANA



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

Así que... ¡¡Sin complejos compañeros!!

**Olga Fernández
Rodríguez**

*Licenciado y Doctor en Veterinaria
por la Universidad de Murcia. Máster en Ciencia
y Bienestar del Animal de Laboratorio, UAB.
Editor de la Revista SECAL. Responsable
Animalario del IMIB- Arrixaca
(Instituto Murciano de Investigación Biomédica).*



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

Desde el año 2008. Cuando llegué y viniendo de un ámbito tan competitivo como la investigación, me sorprendió muy gratamente la generosidad, la empatía y el altruismo de los compañeros, en concreto la lista de distribución de nuestra sociedad y la propia Revista. Aprovecho la ocasión para pedir que no decaiga ese flujo, que seamos activos y conscientes de que a todos nos beneficia un nicho favorable de intercambio de conocimiento, no sólo a los que empiezan; pero que hay que protegerlo y mimarlo porque la confianza puede llegar a ser frágil y sensible a determinados comentarios o críticas.

También es encomiable el trabajazo que hay detrás de la oferta formativa que tenemos en nuestro país, que es una de las más completas de Europa. Recuerdo con mucho cariño y morriña

mi paso por el Máster de la UAB, no sólo por el contenido formativo, sino también por la valiosa red de contactos que me ha permitido hacer.

¿Cómo llegaste al grupo editor de la Revista Animales de Laboratorio de la SECAL?

Me lo propuso el grupo editor durante el Congreso de Salamanca de 2009, yo estaba recién aterrizada de mi doctorado y acepté encantada porque pensé que me "obligaría" a ponerme al día en aspectos nuevos y desconocidos para mí, y me permitiría, por supuesto, arrimar el hombro y aportar mi granito de arena a la revista.

¿A qué revistas de animales de laboratorio tienes acceso?

SECAL, Laboratory Animals y Lab Animal.

Olga Fernández Rodríguez

Aunque el fondo de nuestra revista es Divulgativo Científico, ¿crees que tenemos nivel para estar en otras "ligas"?

Por supuesto que sí, en los últimos años hemos presenciado y disfrutado de una profunda renovación de la publicación; además, somos la revista de referencia de nuestro país y de otras sociedades iberoamericanas, y con un pequeño esfuerzo por parte de todos podríamos competir en otras "divisiones".

De todas maneras, no creo que debiéramos etiquetar a las revistas divulgativas como integrantes de una liga inferior, hay mercado para revistas divulgativas y para revistas indexadas a las que probablemente no accederían la totalidad del colectivo que queremos abarcar en nuestra sociedad, así que ¡¡sin complejos compañeros!!

En otro reglón, pero sin salir de la página... ¿cuál es tu experiencia en el mundo del animal de laboratorio?

Al finalizar la carrera de Veterinaria entré como predoctoral en la Unidad de Cirugía Experimental del Servicio de Cirugía General y Digestivo del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, en Murcia. Allí estuve haciendo el doctorado en variantes técnicas alternativas al trasplante ortotópico hepático clásico. Gracias a esta etapa y al carácter quirúrgico de mi doctorado tuve contacto con una gran variedad de especies: babuinos, cerdos, conejos, rata, ratón y pez cebra. Concluido el doctorado, se planteó en el hospital la construcción de un nuevo centro para investigación básica (rata, ratón, pez cebra) que he estado supervisando hasta su entrada en funcionamiento y que actualmente dirijo.

Los Órganos Habilitados son una figura relativamente nueva. ¿Cómo se lo han tomado los investigadores dentro de tu entorno de trabajo?

Bueno, aunque ya conocían la figura del Comité Ético, todo lo que supone un aumento de burocracia, papeleo y tiempos muertos no es precisamente de su agrado y, hasta cierto punto y poniéndonos en su pellejo, puede ser comprensible. Creo que es labor nuestra "adoctrinarlos", que lo aprecien como una ayuda más que un obstáculo y, por supuesto, que se sientan partícipes del beneficio que sobre la experimentación animal, y sobre su investigación, tienen estas medidas.

Explicanos un poco el nuevo animalario, sus instalaciones y objetivos.

Nuestro nuevo centro está iniciando prácticamente su andadura y el objetivo con el que se diseñó es el de facilitar a la comunidad científica una serie de prestaciones en cuanto a instalaciones, equipamiento y modelos animales, necesarias para el desarrollo de proyectos de investigación que precisen la utilización de animales de experimentación microbiológicamente controlados, especialmente para áreas como oncología, inmunología, trasplante, hematología... en la que la exclusión de contaminantes microbiológicos es crítica para reproducir y validar experimentos. Para ello contamos con una zona de cría con unas rigurosas medidas de bioseguridad, una zona experimental para el personal investigador con entrada independiente, y una cuarentena en la que mantenemos los animales hasta su transferencia embrionaria.

Por otro lado, nos preocupa y estamos bastante sensibilizados con la comunicación con el investigador y actualmente trabajamos, junto a los compañeros del INA de Alicante, en el desarrollo de una herramienta que facilite esa interlocución y las tareas más rutinarias no puramente experimentales, permitiendo a los investigadores la gestión de las colonias telemáticamente sin tener que entrar prácticamente al animalario, lo que indudablemente también mejora el bienestar de los animales que son manipulados por menos personal.

De todas maneras, si de algo puedo presumir es del equipo humano que me acompaña, un grupo de personas muy jóvenes con una entrega y una dedicación sorprendente y totalmente implicadas en el cuidado y bienestar de los animales con los que trabajan; en este sentido me siento muy afortunada.



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

