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

# ANU VIALES Otoño 2019. Número 83 DE LABORATORIO





# 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, youll save time and effort.

Download Advances in immunodeficient models white paper at <a href="mailto:envigo.com/shrn-paper">envigo.com/shrn-paper</a>



# GRUPO EDITOR

### Grupo Editor





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

www.secal.es

**DIRECTORA** 

Lara Sedó Cabezón

**SUBDIRECTORA** 

María Granada Picazo Martínez direccion.revista@secal.es

### **EDITORES DE ESTILO E IMAGEN**

Olga Fernández Rodríguez omfr75@yahoo.es Rubén Mota Blanco

**PUBLICIDAD** 

publicidad.revista@secal.es

**FOTO DE PORTADA** 

Shutterstock

**DISEÑO Y MAQUETACIÓN** 

www.cervantes.agency pluscs@hotmail.com

**IMPRIME** 

LPG

lpatextil@amail.cor

**DEPÓSITO LEGAL** 

M-1362-1999

### Con las pilas cargadas

Hemos cumplido otra meta, el número 83 de la revista "Animales de Laboratorio". Volver de vacaciones, retomar los proyectos laborales inacabados o emprender los nuevos, puede ser al principio algo caótico, y para eso necesitamos organizar y priorizar, primero, nuestra rutina y, luego, retomar lo siguiente. Pero este no ha sido el caso del número 83 de la revista, ya que este número empezó a gestarse a mediados de verano y ahora, al fin, ve la luz, gracias al entusiasmo de todos los que habéis participado en su redacción y edición.

Este número viene cargado de mucho contenido, no sólo en cuanto al número de secciones que han participado, sino también a su calidad. Un número con gran interés científico, divulgativo y técnico para toda nuestra comunidad. En este número, se ha inaugurado la sección "Indicios" y también se han reactivado otras secciones, después de unos meses de silencio, como "Panorama" y "Un modelo al lado de los humanos", todas ellas, junto con las habituales, con temas interesantes y de rigurosa actualidad.

A día de hoy, podemos decir con total seguridad que participar en la revista es algo que nos genera orgullo y satisfacción a todo aquel que lo hacemos, y desde la dirección no podemos estar más felices, ya que es el resultado del trabajo bien hecho durante mucho tiempo, y que poco a poco ha ido calando en cada uno de nosotros hasta convertir la revista en una herramienta de calidad que nos informa y nos ayuda en nuestra profesión además de acercarnos un poco más unos a otros. Pero el trabajo no termina aquí, seguiremos mejorando y adaptándonos a los nuevos tiempos para que nuestra revista no deje de crecer y consolidarse.

¡Feliz lectura a todos!

**Dirección Revista SECAL** 

# EDITORIAI

### 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) Jose Luís Martin Barrasa (2015-2019)

### VICEPRESIDENCIA

Isabel Blanco Gutiérrez (2017-2021)

### **VICESECRETARÍA**

Julia María Samos Juárez (2017-2021)

### **VICETESORERÍA**

Viviana Bisbal Velasco (2017-2021)

### VOCALÍAS

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

# **SOCIOS BENEFACTORES**



- CHARLES RIVER LABORATORIES ESPAÑA, S.A.
- ▶ PANLAB HARVARD APPARATUS, S.L.U.
- ► ENVIGO RMS SPAIN, S.L.
- GRANJA SAN BERNARDO
- JANVIER LABS
- BIOSIS
- ▶ STERIS IBERIA, S.A.
- DINOX, S.L.
- ANADE
- ▶ VESTILAB C.R.C., S.L.U.
- NORAY BIOINFORMATICS, S.L.U.
- ANTONIO MATACHANA, S.A.
- PROLABOR
- BIOGEN CIENTÍFICA, S.L.

- ▶ 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.











Directora LARA SEDÓ CABEZÓN direccion.revista@secal.es



Subdirectora
MARÍA GRANADA
PICAZO MARTÍNEZ
direccion.revista@secal.es



Editora de estilo e imagen OLGA FERNÁNDEZ RODRÍGUEZ omfr75@yahoo.es



Editor de estilo e imagen **RUBÉN MOTA BLANCO** ramota@externo.cnic.es



Publicidad
DAVID
MAYO LÓPEZ
publicidad.revista@secal.es

### RESPONSABLES DE SECCIÓN



Noticias SECAL/Actualidad
SERGI
VILA BELLMUNT
sergivilab@gmail.com



Técnicas
ALEXANDRA
DE FRANCISCO LÓPEZ
afrancisco@hggm.es



Ética y legislación Seguridad en 5 minutos JESÚS MARTÍNEZ PALACIO iesus.martinez@ciemat.es



Al cuidado JULIA SÁNCHEZ GARCÍA julia.g.sanchez@gsk.com



¿Y tú qué opinas?

JOSÉ LUIS

MARTÍN BARRASA

ilmbarrasa@gmail.com



JAVIER
GUILLÉN IZCO
jguillen@AAALAC.org



Control sanitario

JOSEP Mª

MARIMON ESCUDÉ
immarimon@ub.edu



Reproducción y genética MARTA CASADO PINNA mcasado@ibv.csic.es



Anestesia y analgesia
JAVIER
BENITO DE LA VÍBORA
benedictusviper@hotmail.com



In vitro
GUILLERMO
REPETTO KUHN
grepkuh@upo.es



Bienestar animal GARIKOITZ AZKONA MENDOZA gazkona@gmail.com



CEEA-OH
ALBERTO
PASTOR CAMPOS
albertopastor@umh.es



Tinciones y tejidos
ANA ISABEL
NIETO RUÍZ DE ZÁRATE
anieto@ugr.es



ABSLab
FRANCISCO JAVIER
GARCÍA PALOMO
jpalomo@usal.es



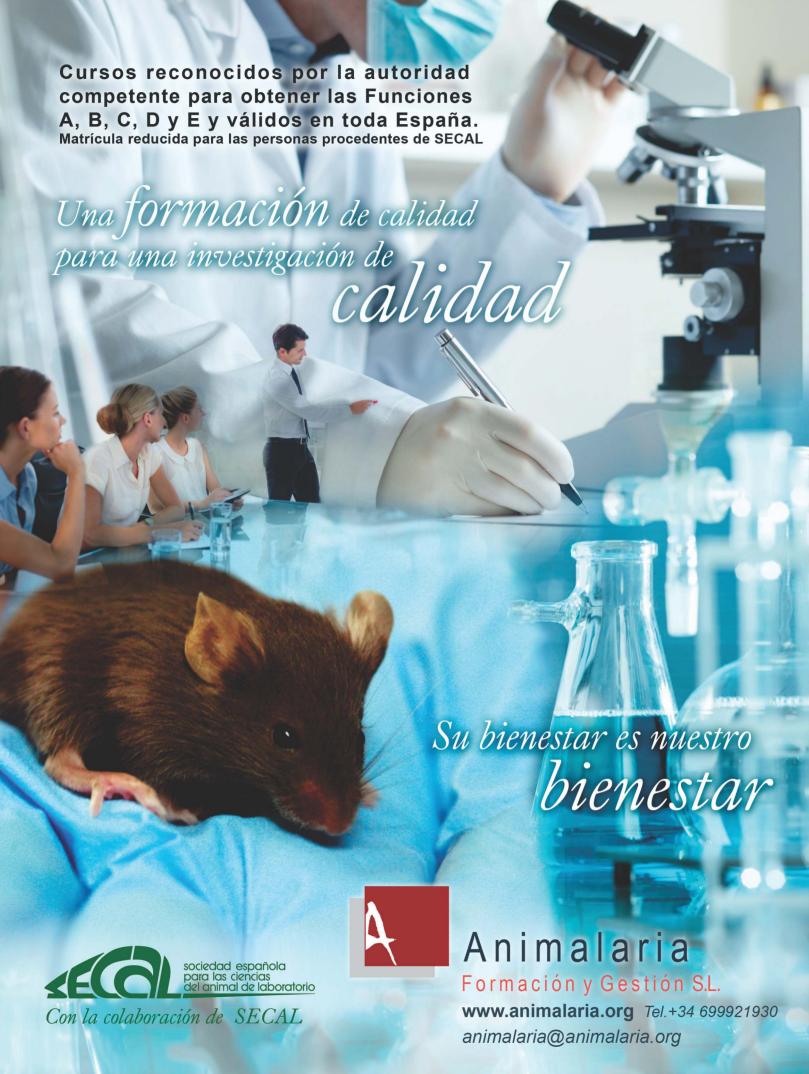
Indicios LOLA GARCÍA OLMO dgarcia@creballeida.org



Entrevista HERNÁN SERNA DUQUE hserna@binaex.com

### Han colaborado en este número

**Teresa Rodrigo**, Cap de les Unitats d'Experimentació Animal de Farmàciai Psicologia; **Helena Paradell**, Zoetis Manufacturing & Research Spain, S.L.; **Marta Giral**, Responsable of Animal Welfare and Designated Veterinarian, Animal Research Facilites Almirall; **Juan Rodríguez**, Consultory Asesor.



# ÍNDICE ÍNDICE ÍNDICEÍ

### **EDITORIAL**

### **8** NOTICIAS

Presentación del segundo Informe anual del Acuerdo COSCE.

### 12 ACTUALIDAD

 Investigadores desarrollan un método más preciso de medir el dolor en ratones, lo que ofrece un potencial para ayudar a los pacientes con dolor crónico.

### 15 TÉCNICAS

 Inducción de un modelo de sepsis en rata mediante técnica de ligadura y punción cecal.

### 20 ÉTICA Y LEGISLACIÓN

 Bioeticawiki: un nuevo recurso disponible para la ética.

### 22 SEGURIDAD EN 5 MINUTOS

Trabajadores especialmente sensibles.

### 24 ALCUIDADO

- Al cuidado de los Danio rerio.

### 27 PANORAMA

 Promoviendo la mejora continua en los animalarios: programa de premios de las 3Rs.

### 33 REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA

 Actividad inesperada de Cre en tejido germinal y durante el desarrollo embrionario.



### **41** ANESTESIAY ANALGESIA

Protocolo anestésico en modelo porcino de cirugía laparoscópica para un modelo de entrenamiento en ginecología avanzada.

### **46** BIENESTAR ANIMAL

El test de la natación forzada a debate.

### 49 TINCIONES Y TEJIDOS

 Relación entre cortes histológicos e imágenes de resonancia magnética nuclear en cerebro adulto de ratón.

### 56 ABSLab

Plan Nacional de Biocustodia.

### 59 INDÍCIOS

Pruebas para el vaciado gástrico en cerdos.

### **62** ENTREVISTA

 Manuel Miguel Jordán Vidal. Vicerrector de Investigación e Innovación. Universidad Miguel Hernández.



# 

## Presentación del segundo Informe anual del Acuerdo COSCE

El pasado 17 de septiembre se presentó en Madrid, el **Segundo Informe Anual del cumplimiento del Acuerdo COSCE de Transparencia** sobre el uso de animales en experimentación científica.

Un total de 140 instituciones se han adherido ya al Acuerdo COSCE de transparencia impulsado en 2016 por COSCE, EARA, SECAL, AAALAC International y el CSIC. Durante este último año han aumentado en 17 las adhesiones.

El acuerdo surgió de la necesidad de establecer vías de comunicación entre la comunidad científica y la sociedad, así como de mejorar el nivel de entendimiento sobre los beneficios, perjuicios y limitaciones que los experimentos con animales pueden conllevar. **Margarita del Val**, Vocal de Ciencias de la Vida y de la Salud de COSCE, introdujo la presentación resumiendo la situación actual: "Las instituciones científicas ya no se esconden o se avergüenzan de investigar con animales, sino que explican claramente a la sociedad cuál es su actividad y que lo hacen de manera ética". También destacó el papel de la formación continua y la cualificación del personal que trabaja con animales.

### Transparencia en Experimentación Animal en España 140



Imagen suministrada por la autoría

# Noticias SECAL AS MICE AS MICE

En la presentación también participó el investigador **Lluís Montoliu** (CSIC), que expuso los datos del último informe del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) sobre el uso de animales para experimentación científica, así como numerosos ejemplos de transparencia en experimentación animal.

Concluyó la presentación **Javier Guillén**, de EARA y AAALAC International, con los resultados más destacados del último informe.



Imagen suministrada por la autoría

La **European Animal Research Association (EARA)** se ha encargado de elaborar el informe a partir de los resultados de una encuesta, que supone el **cuarto compromiso** del Acuerdo. En este segundo año, se han realizado dos tipos de encuesta: una para instituciones que trabajan directamente con animales; y otra para instituciones que no utilizan animales en sus instalaciones, pero en su actividad utilizan los resultados experimentales, como por ejemplo sociedades científicas, asociaciones de pacientes o empresas.

La valoración del 96% de las instituciones tras este segundo año es que el Acuerdo ha sido un paso importante para la investigación biomédica, y un 86% cree que el acuerdo supondrá una mejora real en la apertura de su propia institución.

El Acuerdo COSCE se estructura en **cuatro compromisos** centrados en la comunicación tanto interna como externa de sus actividades.

### NIVEL DE CUMPLIMIENTO DE LOS CUATRO COMPROMISOS DEL ACUERDO

Sobre el **primer compromiso**, "hablar con claridad sobre cuándo, cómo y por qué se usan animales en investigación", el Informe destaca que el 84% de las organizaciones que utilizan animales y el 64% de las que no han realizado acciones voluntarias como la publicación de noticias con avances científicos relacionados con investigación con animales. Estas acciones van más allá de aquellas a las que obliga la legislación actual (RD 53/2013 y Directiva 2010/63/UE), como la declaración estadística a la autoridad competente de los usos de animales y la inclusión de un resumen no técnico de los proyectos en los que se utilicen animales para su posterior publicación en la web del MAPA.

El informe recoge algunos ejemplos de estas acciones como la herramienta VIVO, que permite buscar toda la investigación con animales producida en la Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH), permitiendo incluso acotar la búsqueda por especies animales o enfermedades. Otro de los ejemplos, es el documento elaborado por un grupo de trabajo de la SECAL que, a modo de preguntas frecuentes (FAQs), ha elaborado **un argumentario con 12 preguntas y respuestas** sobre la experimentación animal.

En cuanto al **segundo compromiso**, "proporcionar información adecuada a los medios de comunicación y al público en general sobre las condiciones en las que se realiza la investigación que requiere el uso de modelos animales y los resultados que de ella se obtienen", el informe destaca que el 100% de las instituciones encuestadas han publicado **una declaración en su página web explicando su política** acerca del uso de animales. Tal y como se expone, la aparición de estas declaraciones institucionales ha supuesto el ejemplo más claro y visible de la decisión de las organizaciones firmantes por la transparencia.

El 80% de las instituciones han ofrecido la posibilidad de realizar visitas externas controladas a sus animalarios, en cumplimiento del **tercer compromiso**, "promover iniciativas que generen un mayor conocimiento y comprensión en la sociedad sobre el uso de animales en investigación científica". Se constata además, la variedad de las actividades públicas realizadas por las instituciones firmantes del acuerdo, tales como participación en festivales científicos (38%), presentaciones en eventos locales o de apoyo (25%), así como la celebración de jornadas de días de familia (13%). La mayoría de estas instituciones están muy implicadas en este cometido, tal y como asegura el informe. El 70% de estas instituciones han llevado a cabo alguna actividad pública o tienen

# 

intención de realizar alguna actividad en el futuro. Entre los ejemplos, destaca el vídeo lanzado por la SECAL con motivo del Día del Animal de Laboratorio con el lema "La experimentación animal, da vida".

Con la presentación del Informe, esta comisión también presentó un documento de apoyo a las instituciones, con Recursos online para la Divulgación y la Transparencia en Experimentación Animal.

### COMISIÓN COSCE DE ESTUDIO DEL USO DE ANIMALES EN EXPERIMENTACIÓN CIENTÍFICA

Esta comisión de COSCE es la encargada de coordinar las adhesiones y el cumplimiento de los compromisos del Acuerdo, así como de dar apoyo a las instituciones. La coordinadora de la Comisión es Margarita del Val y los Vocales: Lluís Montoliu, Javier Guillén, Mª Rosario Moyano, Mª Teresa Rodrigo Calduch, Miguel Angel Llamas y José Antonio Solves.

### **BIBLIOGRAFÍA**

- Acuerdo COSCE publicado en 2016.
- Segundo Informe del Acuerdo 2019.
- Recursos online para la Divulgación y la Transparencia en Experimentación animal (2ª edición).





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

### Investigadores desarrollan un método más preciso de medir el dolor en ratones, lo que ofrece un potencial para ayudar a los pacientes con dolor crónico

El dolor es una experiencia compleja que difiere de una persona a otra, lo que lo hace difícil de medir, objetivamente, en humanos. Pero es aún más difícil hacerlo en roedores, considerando que no pueden proporcionar información verbal como las personas. En consecuencia, los investigadores que estudian el dolor se han basado en ensayos de comportamiento que dependen, en gran medida, de cómo el experimentador juzga el comportamiento de un animal.

Durante décadas, los investigadores han utilizado el comportamiento de los ratones para estudiar el dolor, pero algunos han cuestionado la precisión de las interpretaciones de cómo los ratones experimentan el dolor.

Ahora, el neurocientífico Nathan Fried de la Rutgers University-Camden y un grupo de investigadores de la Universidad de Pensilvania (EE. UU.) han desarrollado un método que puede medir con mayor precisión el dolor en ratones, lo que podría llevar a los investigadores a descubrir nuevas formas de tratar el dolor en pacientes humanos.

"Cuando toco la pata de un ratón, este la retira. Ese movimiento de retirada es el comportamiento en el que hemos confiado durante décadas para determinar si un analgésico está funcionando. Pero esa retirada es, aparentemente, la misma, no importa si es un suave cepillo o una aguja afilada", ha descrito Fried. "Entonces, si un ratón mueve su pata, ¿cómo podemos estar seguros de que es porque le duele?".

El estudio, que ha sido publicado en la revista Cell Reports, ha sido realizado utilizando un vídeo en cámara lenta, técnicas modernas de neurociencia e inteligencia artificial (ver Figura 1). De esta manera los investigadores han creado una escala de dolor en los ratones.

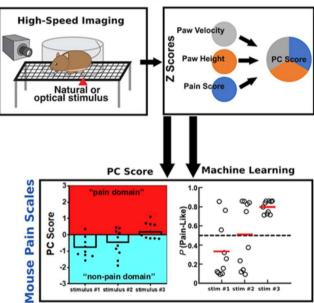


Imagen suministrada por la autoría

Figura 1.- Los autores han utilizado imágenes de alta velocidad, modelado estadístico y aprendizaje automático para crear una escala de dolor de ratón para evaluar la sensación de estímulos nocivos, inofensivos y optogénicos. Créditos: Imagen de Abdus-Saboor et al. Development of a Mouse Pain Scale Using Sub-second Behavioral Mapping and Statistical Modeling. Rep. Celular. 2019;28(6):1623-34.e4. Creative Commons - No Comercial-No Derivado (CC BY-NC-ND 4.0).

Los vídeos de los científicos revelaron que cuando tocaban la pata del animal con un hisopo de algodón, el ratón levantaba la pata y la volvía a colocar. Sin embargo, cuando un investigador golpeaba el animal con un pinchazo, el animal movía su pata, la sacudia y tiraba de su cuerpo hacia atrás o la soltaba en el aire.

"Es importante destacar que, en lugar de simplemente decir si el ratón tiene dolor o no, ahora podemos evaluar el grado de dolor que tiene el ratón", ha señalado.

"Necesitamos hacer un mejor trabajo para ayudar a los pacientes con dolor crónico sin usar opioides", ha continuado el investigador, que asegura que "probar el tratamiento del dolor en ratones ha sido muy difícil. Este nuevo proceso refina nuestra capacidad para determinar si un ratón tiene dolor, lo que aumenta nuestra confianza en si un nuevo tratamiento funcionará en humanos"

"En general, creo que este estudio fue bastante impresionante porque los autores analizaron con mayor detalle las respuestas al síndrome de abstinencia a las que la gente no ha prestado mucha atención, a pesar de que los investigadores han estado usando estos ensayos de abstinencia durante mucho tiempo", señaló Jeffrey Mogil, de la Universidad McGill de Montreal, Canadá, que no participó en la investigación.

"Realmente, aprecio el hecho de que se fijaran en las diferencias entre cepas y sexo, ya que esto es bastante raro", continuó. "También es realmente impresionante que hayan ido más allá del mero desarrollo del método, pero que también hayan validado sus hallazgos con los experimentos de Von Frey y los experimentos optogenéticos, que podrían haber sido publicaciones separadas por sísolas", según Mogil.

Fried ha expresado que otros investigadores pueden aprovechar su trabajo utilizando la nueva técnica en sus laboratorios. Él imagina un software disponible al público que los investigadores puedan descargar y usar para sus propios estudios sobre el dolor.

"Si podemos crear un software de código abierto", ha planteado Fried, "entonces es más probable que otros laboratorios lo usen. Y si mejoramos la precisión de nuestras mediciones de dolor en ratones, aumentarán, inevitablemente, las posibilidades de que encontremos nuevas terapias para el dolor en humanos".

### **BIBLIOGRAFÍA**

- Abdus-Saboor I., Fried N.T., Lay M., Burdge J., et al. Development of a Mouse Pain Scale Using Sub-second Behavioral Mapping and Statistical Modeling. Cell Rep. 2019; 28(6):1623-34.e4.
- Infosalus: Investigadores desarrollan una escala del dolor en los
- Rutgers University-Camden: Research Introduces a More Accurate Way to Gauge Pain in Mice, Yielding Potential to Help Chronic Pain Patients.
- Video: Improving the study of pain (Rutgers University-Camden): https://youtu.be/veobTYgpCC8



publicidad.revista@secal.es







Pídelo, que nosotros nos encargamos de todo.



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



En 24h recibirás un kit con intrucciones 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\*

PRIMER ANALISIS GRATUITO\*
T 948 40 26 28 / info@vuler.es / www.vuler.es

\*Consulta condiciones en nuestra web.

# Inducción de un modelo de sepsis en rata mediante técnica de ligadura y punción cecal

Mª Ángeles González-Nicolás Gonzalez<sup>1,2</sup> y Alberto Lázaro Fernández<sup>1,3</sup> Laboratorio de Fisiopatología Renal, Departamento de Nefrología, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Hospital Gregorio Marañón

Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid

### INTRODUCCIÓN

La sepsis es una respuesta inflamatoria sistémica frente a una infección y su aparición condiciona un mal pronóstico en el contexto del síndrome de disfunción multiorgánica<sup>1</sup>. Durante la sepsis hay dos fases hemodinámicas que pueden solaparse. En la fase inicial (hiperdinámica), hay una producción masiva de citoquinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno, que afectan a la permeabilidad vascular, la función cardiaca e inducen cambios metabólicos culminando en la necrosis tisular y fallo multiorgánico. Como consecuencia, la causa más común de mortalidad es la insuficiencia renal aguda. La segunda fase (hipodinámica) es un proceso antiinflamatorio que implica disminución de la proliferación y función de linfocitos, y aumento de la apoptosis<sup>2</sup>.

Para entender este síndrome en sus distintos niveles, es fundamental contar con un modelo animal adecuado y completo que reproduzca el curso clínico de la enfermedad, a fin de obtener resultados consistentes y reproducibles. Para el estudio de la etiología de la sepsis humana se han desarrollado diferentes modelos animales3:

- 1. Administración de toxinas exógenas, como el lipopolisacárido (LPS).
- 2. Administración de patógenos viables o modelo de infección y contaminación peritoneal (PCI).
- 3. Alteración de la barrera protectora endógena del animal: modelo de ligadura y punción cecal (CLP) y peritonitis del stent de colon ascendente (CASP).

La CLP se ha utilizado ampliamente en los últimos 30 años para estudiar la fisiopatología de la sepsis y está ampliamente descrita en la literatura<sup>4</sup>. En comparación con otros modelos, proporciona una mejor representación de la complejidad de la sepsis humana, ya que implica una combinación de tres tipos de daño: trauma tisular debido a la laparotomía, necrosis causada por la ligadura del ciego y infección debida a la fuga de flora microbiana en el peritoneo. La técnica CLP satisface muchos de los criterios esenciales de un buen modelo de sepsis: es un procedimiento simple, de naturaleza polimicrobiana, con un foco infeccioso localizado y los productos bacterianos liberados en la periferia pueden conducir a septicemia<sup>5</sup>. Es capaz de generar una respuesta inmune exacerbada y el perfil de citoquinas es similar al observado en la sepsis humana. La variabilidad de la CLP se considera una ventaja, ya que el procedimiento puede ser adaptado para inducir un rango de severidad que permita así la investigación de sepsis aguda y crónica. El modelo CLP ha sido considerado como Gold standard por mostrar un alto grado de similitud con la progresión de la sepsis humana<sup>6</sup>.

El objetivo de este trabajo es describir la técnica de ligadura y punción cecal en un modelo de rata. Es una de las opciones elegidas con mayor frecuencia para simular la progresión de la sepsis humana y para la búsqueda de alternativas terapéuticas que frenen su avance. También se comparará con el otro modelo de elección a la hora de establecer un modelo séptico, como es el

### **Técnicas**

### MATERIAL NECESARIO

### Instrumental quirúrgico

Mosquito tipo Hartman recto (72-8957), escalpelos desechables nº 11, pinzas 18,0 cm curvas, 0,3 mm (72-0443), pinzas rectas 17,5 cm (72-0141), pinzas curvas 17,5 cm (72-0142), micro tijeras rectas afiladas Vannas 12,0 cm (72-0143), portaagujas Olsen-Hegar 12,0 cm (72-8898), pinzas de tejido Adson 12,0 cm con diente (72-8573), tijeras rectas 10,5 cm (72-8426), tijeras de cirugía rectas 14,5 cm (72-8393), tijeras rectas modelo Tübingen 8,5 cm (72-8696), pinzas dentadas curvas 10,0 cm, puntas 0,7 mm (72-8604), porta-agujas 12,0 cm (72-8884), tijeras rectas de disección (RU-1250-14M) y pinza hemostática (RU-3122-10).

### Medicamentos

Ketamina (50-100 mg/kg), xilacina (5-15 mg/kg), diazepam (5 mg/kg), buprenorfina (0,01-0,1 mg/kg) y solución salina 0,9%.

### Otros

Sutura trenzada 3-0 no reabsorbible (Lorca Marín 55328), sutura 4-0 (Lorca Marín 55345), gasas, esparadrapo, jeringas 10 y 50 ml, agujas 21G (BD 305917) y 25G (BD 305916), mesa quirúrgica, luz de quirófano, manta eléctrica, catéteres intravenosos 14G (BD381867), 16G (BD381857), 20G (BD381833), luz infrarroja, paños quirúrgicos estériles, lubricante oftalmológico, etanol 70%, clorhexidina, povidona yodada, material para recogida de muestras, tubos de suero y hemograma, crioviales, maquinilla de afeitar, bandeja de metal, empapadores, guantes estériles, bata, gorro y mascarilla.

### PROCEDIMIENTO

1. Previamente a la cirugía, los animales son anestesiados intraperitonealmente (IP) con una mezcla de ketamina 90 mg/kg y diazepam 5 mg/kg (también se puede administrar xilacina 15 mg/kg). Tras rasurar la parte media del abdomen, se coloca al animal sobre una manta térmica a 37°C en decúbito supino, en un campo limpio. Se inmoviliza al animal y se comienza el procedimiento quirúrgico en condiciones de esterilidad. El cirujano debe utilizar guantes, bata, gorro y mascarilla. El material quirúrgico utilizado debe ser esterilizado en autoclave, en nuestro caso, con un ciclo de 134°C durante 45 minutos.

2. Se aplica lubricante oftálmico para evitar que se reseque la córnea durante el procedimiento. Primero se desinfecta la zona con solución de povidona yodada o clorhexidina, seguido de limpieza con alcohol al 70% (ver Figura 1).



Imagen suministrada por la autorí

Figura 1.- Colocación pre-cirugía.

 Se coloca sobre la rata un paño quirúrgico estéril y se recorta una pequeña ventana alrededor creando un campo quirúrgico donde se va a realizar la cirugía. Mediante una laparotomía media (incisión de 2 cm) (ver Figura 2), se exterioriza el ciego con el intestino adyacente (ver Figura 3A y 3B).

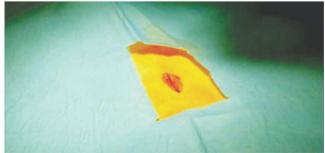
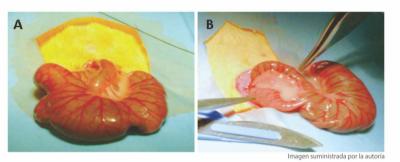


Imagen suministrada por la autoría

Figura 2.- Laparotomía media.



**Figura 3.- A.** Exposición del ciego. **B.** Exposición total del ciego junto con intestino adyacente.

4. Se realiza una ligadura por debajo de la válvula ileocecal con seda trenzada 4-0, evitando la obstrucción intestinal de forma que no frene del todo el tránsito intestinal. Para asegurar que la ligadura es correcta, se coloca una cánula de 16G sobre el ciego (ver Figura 4A y 4B) y se realizan los nudos sobre dicha cánula. Luego, se extrae la cánula y se comprueba que la ligadura no oprima demasiado (ver Figura 4C). A continuación, se realiza una segunda ligadura a 1,5 cm aproximadamente de la primera, dejando 0,75 cm a la punta del ciego (ver Figura 5).



**Figura 4.- A.** Colocación del catéter sobre el ciego. **B.** Primera ligadura del ciego sobre el catéter. **C.** Primera ligadura del ciego terminada bajo la válvula ileocecal.



**Figura 5.- A.** Comienzo de la segunda ligadura a 1,5 cm de la primera. **B.** Segunda ligadura terminada. **C.** Aspecto de cómo quedan las ligaduras del ciego con sutura 4-0.

5. Con las dos ligaduras hechas, se perfora el ciego tres veces entre las dos con la punta de un catéter del calibre 16G (ver Figura 6). En la parte que queda fuera de la ligadura, se perfora una vez con la punta de un catéter del calibre 14G.



Figura 6.- Punción del ciego con punta de catéter 16G.

6. Se presionan suavemente todas las punciones hasta exteriorizar el contenido fecal al espacio intraluminal (columna de 1 mm) (ver Figura 7). En los animales control, el ciego también se expone, pero no se liga ni se perfora.



Imagen suministrada por la autoría

Figura 7.- Extrusión de heces por presión de una de las punciones.

7. Finalmente, se reintroduce el ciego en la cavidad peritoneal y se sutura la pared abdominal por capas, primero se cierra la musculatura del abdomen y luego se cierra la piel con sutura 3-0 no absorbible (ver Figura 8). Al terminar, se vuelve a limpiar y a desinfectar la zona con clorhexidina.

### **Técnicas**



**Figura 8.- A.** Comienzo del cierre de la pared abdominal con sutura 3-0. **B.** Aspecto final del cierre de la pared abdominal. **C.** Cierre de la piel terminado y desinfección con clorhexidina.

- 8. En el postoperatorio inmediato, se inyecta una solución de reanimación de manera subcutánea consistente en suero salino 0,9% (50 ml/kg). Se realiza como medida de soporte hemodinámico inicial y para cubrir posibles pérdidas de volumen sanguíneo durante el tiempo quirúrgico. Cada 12 horas, a partir de la operación, se administra analgesia consistente en buprenorfina vía subcutánea (0,05 mg/kg).
- 9. Como protocolo de monitorización post-cirugía, durante el periodo de recuperación, se realiza una vigilancia cada 10-20 minutos para asegurar la recuperación total del animal, en un ambiente tranquilo y con temperatura controlada con luz infrarroja sin dañar al animal. El tiempo de recuperación varía de 30 minutos a 1 hora. Después se le proporciona acceso libre a comida y agua. Desde la inyección IP de la anestesia hasta el final de la cirugía, la duración del procedimiento es de 30 minutos aproximadamente.

### **RECOGIDA DE MUESTRAS**

Según la finalidad y duración del modelo, las muestras se pueden recoger en diferentes tiempos, desde 48 horas a una semana después del procedimiento quirúrgico. Si es necesaria la recogida de orina de 24 horas y/o heces, las ratas son introducidas en jaulas metabólicas el día anterior. Para la eutanasia, el animal es anestesiado con ketamina/diazepam (o ketamina/xilacina) y se procede a la recogida de muestras, como sangre y tejidos. Los parámetros hemodinámicos en suero y orina se determinan usando un autoanalizador estándar.

Para evaluar el resultado del procedimiento se pueden analizar diferentes parámetros en órganos y/o fluidos. Como, por ejemplo: supervivencia, citocinas y quimiocinas, y tipo y carga bacteriana medida como el número de UFC/mililitro.

### **CONCLUSIONES**

- La técnica CLP es la más utilizada porque reproduce mucho mejor la progresión y características de la sepsis humana: respuestas inmunes, hemodinámicas y bioquímicas. En comparación con otros modelos animales de sepsis, CLP se puede realizar en cualquier animal de diferentes edades y sexo.
- Es un procedimiento quirúrgico relativamente fácil y barato. Representa la infección polimicrobiana del peritoneo, con un foco infeccioso localizado y presenta el espectro completo de patógenos entéricos. Se asemeja a la situación clínica de perforación intestinal, con la resultante infección bacteriana mixta de origen intestinal y, por lo tanto, puede ser el modelo más realista de sepsis clínica. Además, tiene un curso de tiempo prolongado para el desarrollo del estado de shock, que son comparables a las encontradas en humanos.
- El grado de severidad tiene un impacto directo en el porcentaje de supervivencia. La longitud de la ligadura, el grosor del catéter con el que se van a realizar las punciones y el número de punciones son parámetros que pueden controlarse para modular la gravedad y mortalidad. Cuando se realiza el modelo CLP, todas estas condiciones y los parámetros técnicos deben ser cuidadosamente considerados con el fin de obtener resultados reproducibles y consistentes. Por lo tanto, un profundo conocimiento y dominio de este procedimiento es absolutamente necesario para realizar el modelo CLP con precisión.
- Este modelo induce un escenario inflamatorio más agresivo y se asemeja a la complejidad de la sepsis humana. Se debe emplear un curso de tiempo más largo, ya que el tratamiento induce el desarrollo retardado de la inflamación sistémica, y un empeoramiento en el estado de salud que persiste hasta el final del experimento.
- En comparación con el modelo de LPS (muy utilizado también junto con el de CLP), éste no reproduce la intensidad y la progresión del shock séptico. Es el más adecuado cuando interesa estudiar nuevas terapias para la inflamación aguda o para estudiar los procesos fisiopatológicos de endotoxemia. También tiene ventajas, como la facilidad técnica y alta reproducibilidad, particularmente en la respuesta inflamatoria provocada, ya que se puede lograr en poco tiempo (4 a 6 horas) de manera simple y con una baja tasa de mortalidad, además se vuelve a un estado normal en 72 horas.

Los efectos son fácilmente identificables y medibles. Sin embargo, el modelo LPS no reproduce exactamente los rasgos característicos que ocurren en el humano. Las respuestas de citocinas son de menor duración, debido a que se establece utilizando un único factor inductor.

- Una desventaja de la técnica CLP es que no facilita el control de la cantidad de heces extruidas cuando el ciego se presiona. La flora del intestino no es uniforme entre animales o especies y las comparaciones entre estudios deben hacerse con precaución, además, de las variaciones en los procedimientos quirúrgicos y postoperatorios. Se sabe que la estandarización es difícil, depende de la técnica utilizada y de la experiencia del cirujano.
- También hay que tener en cuenta que el uso de opiáceos, como la buprenorfina, puede suprimir la respiración y la locomoción, y estos efectos pueden ser mal interpretados como signos de sepsis.

Como conclusión, cada modelo tiene sus beneficios, que deben ser sopesados con los parámetros experimentales a investigar y el objetivo general a estudiar. Pero sin duda, el modelo de CLP es considerado como el *Gold Standard* por ser el que mejor reproduce la progresión de la sepsis humana.

### **BIBLIOGRAFÍA**

- Breen D. and Bihari D. Acute renal failure as a part of multiple organ failure: the slippery slope of critical illness. Kidney Int Suppl. 1998;66:S25-33.
- 2. Toscano M.G., Ganea D., and Gamero A.M. Cecal Ligation Puncture Procedure. J. Vis. Exp. 2011;51:e2860.
- 3. Seemann S., Zohles F., and Lupp A. Comprehensive comparison of three different animal models for systemic inflammation. Journal of Biomedical Science. 2017;24:60.
- 4. Hubbard W.J., Choudhry M., Schwacha M.G., et al. Cecal ligation and puncture. Shock. 2005;24(1):52-7.
- Wichterman K.A., Baue A.E., and Chaudry I.H. Sepsis and septic shock a review of laboratory models and a proposal. J Surg Res. 1980;29(2):189-201.
- Dejager L., Pinheiro I., Dejonckheere E., et al. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? Trends Microbiol. 2011;19(4):198-208.



### Ética y Legislación

### Bioeticawiki: un nuevo recurso disponible para la ética

### Jesús Martínez Palacio

Presidente del Órgano Habilitado, OEBA-CIEMAT

Os presento en esta ocasión, un recurso web que he encontrado interesante con la vista puesta en la ética y, específicamente, en la ética en experimentación animal.

Bioeticawiki es, según su propia definición, una enciclopedia escrita de forma colaborativa por sus lectores. Que se caracteriza por:

 Ser una enciclopedia, entendida como soporte que permite la recopilación, el almacenamiento y la transmisión de información de forma estructurada.

- 2. Ser un *wiki*, por lo que, con pequeñas excepciones, puede ser editada por cualquiera.
- 3. Ser de "contenido libre", entendiéndose que presenta una licencia especial, que permite el uso del contenido bajo unas determinadas condiciones (*Creative Commons*).

En esta web encontramos múltiples contenidos o artículos referidos a múltiples conceptos y temas de bioética. Entre ellos, destaco el relativo a la Experimentación Animal.

A continuación, podéis ver un pantallazo de su definición:

### Experimentación animal (ética)

Artículo Discusión



La experimentación animal es hoy una actividad básica de la ciencia médica. A ella se oponen los movimientos pro derechos animales, normalmente fundados en una visión meramente natural del hombre y los animales, que los iguala. También hay oposición desde el punto de vista científico: los resultados de la investigación animal rara vez serían directamente aplicables al hombre. Por contra, los resultados encontrados en los animales son parcialmente aplicables al hombre, y la diferencia cualitativa entre el hombre y el animal es el fundamento que permite la experimentación animal.

De estos fundamentos se derivan una serie de normas éticas sobre el trato correcto de los animales de experimentación. Estas normas han sido recogidas también en leyes específicas.

Imagen suministrada por la autoría

Y de los contenidos que desarrolla:

### Sumario ocultar

- 1 Introducción
- 2 Oposicion a la investigación en animales
  - 2.1 El activismo anti experimentación animal
  - 2.2 La liberación animal
  - 2.3 Planteamientos científicos anti experimentación animal
  - 2.4 Epistemología y ética de la experimentación
- 3 Fundamentos éticos para el respeto a la naturaleza
  - 3.1 El valor de la naturaleza
  - 3.2 El valor del hombre

- 4 La regla de las 3R
  - 4.1 Reemplazar
  - 4.2 Reducir
  - 4.3 Refinar
- 5 Normativas
  - 5.1 Normativa europea
  - 5.2 Ley española
- 6 Normas PBL
- 7 Problemas prácticos
  - 7.1 Trabas y papeleos
  - 7.2 El comité de ética y la ética del investigador

7.3 La realidad: ayuda a optimizar la investigación 7.4 Supervisión

8 Bibliografía

9 Referencias

Imagen suministrada por la autoría

Os recomiendo revisar este artículo, pues lo he encontrado muy razonable, informativo y digno de lectura. No descarto que algunos de sus puntos formen parte de esta sección en el futuro.

Como curiosidad, resaltar la revisión al respecto de la visión del "catecismo de la iglesia católica" sobre el respeto a los animales y su naturaleza. No hay que olvidar que esta visión fue el fundamento moral durante siglos...

En resumen, una buena fuente de información en general sobre bioética, y una revisión curiosa de la ética en la experimentación animal.

### **BIBLIOGRAFÍA**

- Bioeticawiki: https://www.bioeticawiki.com/Bioeticawiki
- Creative commons: https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/deed.es
- Experimentación Animal: https://www.bioeticawiki.com/Experimentación\_animal\_(ética)





### Trabajadores especialmente sensibles

Hoy reproducimos una información del Dr. Antonio Meléndez, especialista en Medicina del Trabajo, que explica cuándo un trabajador puede ser considerado especialmente sensible.

### Jesús Martínez Palacio

Técnicos en Prevención de Riesgos Laborales

El concepto de "trabajador especialmente sensible" se establece en el artículo 25.1 de la Ley de Prevención de Riesgos Laborales, como aquél que por sus características personales o estado biológico conocido incluidos aquellos que tengan reconocida la situación de discapacidad física, psíquica o sensorial sea especialmente sensible a los riesgos derivados del trabajo. Esto no nos dice mucho, la verdad...

El mismo artículo, indica que se deberán tener en cuenta estas condiciones en las evaluaciones de los riesgos y, en función de éstas, se adoptarán las medidas preventivas y de protección necesarias.

Finalmente, establece que los trabajadores no serán empleados en aquellos puestos de trabajo en los que a causa de su especial sensibilidad (debidamente reconocida) puedan ellos, los demás trabajadores u otras personas relacionadas con la empresa ponerse en situación de peligro o, en general, cuando se encuentren manifiestamente en estados o situaciones transitorias que no respondan a las exigencias psicofísicas de los respectivos puestos de trabajo.

De este artículo, surgen tres interrogantes para la consideración del trabajador especialmente sensible:

- La existencia de características personales o un estado biológico conocido que suponga una especial sensibilidad a los riesgos derivados del trabajo.
- La presencia de discapacidad física, psíquica o sensorial.
- Cuando esta discapacidad afecta al trabajo.

### ¿Qué son "características personales" en función del Art. 25 de la Ley de Prevención de Riesgos Laborales?

Se refiere a la existencia de patologías físicas, psíquicas o cualquier otra afectación o deficiencia en el estado de salud que, aunque no generen incapacidad laboral o discapacidad, puedan agravarse por las condiciones de trabajo y/o impidan al trabajador dar respuesta a las exigencias psicofísicas del puesto.

### ¿Qué se entiende por discapacidad?

La presencia de deficiencias físicas, mentales, intelectuales o sensoriales. A efecto legal tendrán la consideración de personas con discapacidad aquellas a quienes se les haya reconocido un grado igual o superior al 33%.

### ¿Cuándo una discapacidad reconocida implica considerar a un trabajador como especialmente sensible?

Para su consideración se debe establecer la especial sensibilidad a los riesgos del trabajo. Un trabajador con discapacidad reconocida, si ésta no está relacionada con los factores de riesgo existentes en el puesto de trabajo, no se le deberá considerar como especialmente sensible.

Otra situación sería, si como consecuencia de la exposición a los riesgos inherentes al puesto de trabajo pudiera agravarse dicha discapacidad, en este caso sí sería de aplicación el artículo 25.1 y pasaría a ser considerado trabajador especialmente sensible.

### **BIBLIOGRAFÍA**

 https://www.quironprevencion.com/blogs/es/prevenidos/trabajador es-especialmente-sensibles



# Complete Care Competence

### Asegurando su Investigación



### Su Colaborador para el Cuidado del Animal de Laboratorio

Experimente la diferencia: soluciones completas para su trabajo de investigación. Benefíciese de la competencia del fabricante en las ciencias del animal de laboratorio.

Quality. Reliability. SAFEty.



Diets Custom Diets Bedding Enrichment Services









DIETS

CUSTOM DIETS BEDDING

ENRICHMENT

# 24

### Al cuidado de los Danio rerio

### **Eduardo Diaz García**

Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares

Aunque el trabajo con *Danio rerio* tiene muchas similitudes con el trabajo con ratones, también tiene sus propias peculiaridades, principalmente, dos: los peces respiran agua, no aire, y no cuidan de su descendencia.

A los peces, al igual que a los ratones, se los mantiene en cubetas ubicadas en módulos que, en lugar de disponer de aire filtrado, disponen de agua filtrada. Pero el concepto es el mismo. La diferencia estriba en que, mientras que el aire tiene la misma composición química en todas partes, el agua no. Cada cauce fluvial corre por su propio lecho rocoso y el agua disuelve moléculas de este. Los distintos cauces fluviales tienen, por tanto, su propia conductividad y su propio pH, y los peces que viven en ellos se han adaptado a esos parámetros. Por ello, hay que replicar esos parámetros en cautividad. Así que lo primero que hago cuando entro cada mañana en el acuario es comprobar el pH y la conductividad del agua, para estar seguro de que se encuentran dentro del rango aceptado para la especie. Al ser animales subtropicales de sangre fría, también hay que proporcionarles la misma temperatura a la que se encuentran en la naturaleza.

Desde el punto de vista del manejo, los peces no te van a morder, no te van a transmitir ningún patógeno, no te van a dejar la ropa y el pelo oliendo (bastante mal) ni van a ponerse a chillar si tienes que pincharlos, eso facilita muchísimo su manejo. Para entrar en un acuario no es necesario cambiarse de ropa ni vestir gorro ni mascarilla, con unos guantes es suficiente. Además, son animales diurnos y no tienes que molestarlos despertándolos si hay que limpiarles la cubeta o hacer la inspección diaria de los animales.

¡A mí que me den peces, los ratones, para el que los quiera!

# CUIDADO AL CUIDADO



No pretendo, con esto, dar la imagen de que el trabajo con peces no tiene ningún inconveniente. Como mencioné antes, no cuidan de sus propias crías, así que ese trabajo te corresponde hacerlo a ti. Uno de los primeros problemas con los que se encuentran los que empiezan a trabajar con estos animales es la mortalidad de los alevines. Se necesita cierta experiencia para lograr su supervivencia. Por desgracia, yo mismo me he encontrado varias veces con investigadores que opinan que tu trabajo se limita a darles de comer (y mientras te lo dicen, hacen el gesto de frotar los dedos índice y pulgar para que veas cómo se les da de comer), y poco más. Es decir, piensan que cuidar del acuario de un centro de investigación científica es como cuidar de tu pecera en casa. Eso es como pensar que cuidar de un animalario de ratones es como cuidar de tu hámster.

Y es que los peces son animales de segunda división. Muchas veces se montan acuarios habilitando estancias que no se construyeron con ese propósito (yo estuve a punto de irme a trabajar hace unos años a un antiguo establo para cabras) o en la parte que nadie quiere. El animalario, en el que trabajo ahora, tiene todas sus habitaciones rectangulares, hasta los despachos... menos el acuario que, como se montó en la esquina que sobró, tiene una forma tan rara que nos costó mucho distribuir los módulos de manera que se maximizase el espacio. Conozco un caso en el que el acuario se montó en un piso superior y ahora no puede haber más de cinco personas a la vez en el mismo, por el riesgo de que el suelo ceda por exceso de peso.

Tampoco se da importancia al personal que ha de encargarse del mismo y, muchas veces, se escoge a gente sin experiencia, que se encuentra con muchísimos problemas de puesta de huevos, supervivencia de los alevines y crecimiento de estos.

En cuanto a los usuarios, no voy a desvelar nada nuevo. Pasa exactamente lo mismo que con los ratones; cuanto menos toquen, mejor. No obstante, mi opinión es que siempre es mejor ser amigo de tus usuarios. Es cierto que cuando les das mucha confianza, a veces, se aprovechan de ello; pero, en conjunto, y teniendo en cuenta que nada hay perfecto por muy beneficioso que sea, prefiero darles esa confianza. Tener una relación de amistad con tus usuarios hace el trabajo diario mucho más agradable. Si sabes marcar un límite y decir no, no pasa nada por hacerles unos cuantos favores; a ellos les beneficia y te lo agradecen.

Yo creo que parte de mi trabajo como responsable de área es, o debería ser, crear un ambiente laboral agradable. Me gusta pensar que tanto mis usuarios como mis ayudantes están contentos trabajando en el acuario. Me gusta romper esa barrera de cristal que hay entre los investigadores y el personal del animalario y que unos se relacionen con otros, que charlen sobre temas de interés común. Me gusta que los usuarios conozcan por su nombre a mis ayudantes y que les expliquen qué experimentos están haciendo con los peces; pues si éstos lo desconocen, tienen la sensación de que su trabajo no sirve para nada, que lo mismo da trabajar en un centro de investigación científica que en cualquier otro lado. Conocer el experimento te ayuda a implicarte en el mismo.

Un acuario es un lugar cerrado y, habitualmente, estrecho en el que diariamente trabaja junta gente sin ninguna otra vinculación. Pero, ya que los peces son animales de segunda división y no suele haber muchos usuarios interesados en investigar con ellos, seamos inteligentes y aprovechemos esa circunstancia para crear un ambiente de trabajo armónico y familiar. Se nos recompensará con creces.

# Your global operating experts in lab animal diets.





As an ISO-certified company with over 50 years of experience we offer you standardized animal nutritional solutions and customized special diets.



Suministros para animalarios



# Promoviendo la mejora continua en los animalarios: programa de premios de las 3Rs

### **Helena Paradell Trius**

Zoetis Manufacturing & Research Spain, S.L.

### LOS PRINCIPIOS DE LAS 3RS

Los principios de las 3Rs (Reemplazo, Reducción y Refinamiento) son uno de los ejes básicos en la regulación del uso de animales para la investigación. Estos principios fueron formulados, por primera vez, por dos biólogos de origen inglés, W.M.S Russell y R.L. Burch en su libro "The Principle of Humane Experimental Technique" publicado en 1959.

El principio de Reemplazo se refiere a todos aquellos métodos y modelos que permiten evitar o sustituir el uso de animales por modelos *in vitro*, modelos informáticos, etc. El principio de Reducción se refiere a aquellos que permiten reducir el número de animales utilizados en cada uno de los proyectos de investigación. Mientras que el de Refinamiento se refiere a métodos que minimicen el sufrimiento de los animales y/o que mejoren su bienestar.

Hoy en día estos principios son el marco dentro del cual la investigación biomédica se realiza con garantías científicas y éticas. Por este motivo han sido incorporados tanto en las legislaciones nacionales e internacionales, como en las políticas y reglamentos internos de instituciones públicas y privadas.

### NUESTRO COMPROMISO CON LAS 3Rs

Todos los centros en los que trabajamos con animales de experimentación tenemos el compromiso ético y legal de aplicar los principios de las 3Rs de manera rutinaria y continua en nuestro trabajo.

Una motivante iniciativa promovida, generalmente, desde los equipos de Dirección, para involucrar a todo el personal que trabaja directa e indirectamente con los animales, es la instauración de los programas de premios a los proyectos 3Rs. Estos programas premian a personas individuales o grupos de trabajo (generalmente multidisciplinarios) que desarrollan

proyectos y/o introducen mejoras en las instalaciones, con el objetivo de utilizar menos animales y/o de mejorar el bienestar de los que necesariamente deben ser utilizados para el desarrollo de las actividades científicas. Este reconocimiento es una gran inyección de energía y motivación para las personas que participan, sin darse muchas veces ni cuenta, en la mejora continua de los animalarios.

A continuación, os presento el programa de premios a las 3Rs que tenemos sólidamente instaurado en Zoetis, el cual es un gran evento y goza de una amplia expectación y participación de personas de todas las plantas y departamentos, desde técnicos de animalario, investigadores, personal de mantenimiento, etc.

### PROGRAMA INSTITUCIONAL DE PREMIOS A LAS 3Rs

Zoetis desde su creación (y anteriormente como Pfizer) tiene instaurado un Programa Global de premios a las 3Rs. Este programa es uno de los principales reflejos del compromiso adquirido por la empresa en la promoción e implementación de alternativas que reemplacen, reduzcan y/o refinen el uso de animales tanto en la investigación, como en las prácticas que se integran en el cuidado humanitario de los animales de laboratorio y en el desarrollo científico que realiza, en el cual los animales juegan un papel vital.

Los premios a las 3Rs reconocen tanto a personas individuales como a equipos de las diferentes plantas de Zoetis de alrededor del mundo, que hayan desarrollado un método nuevo que suponga un avance en el marco de las 3Rs; que hayan implementado de manera satisfactoria y significativa los principios de las 3Rs en su trabajo; o que hayan desarrollado un programa que mejore el entendimiento de los principios de las 3Rs como elementos críticos en el proceso de investigación.

### Panorama

Las nominaciones pueden presentarse a lo largo de todo el año y pueden ser presentadas por un compañero, un supervisor o un jefe de departamento, en nombre de una persona individual o de un grupo-equipo de trabajo; aunque las auto-nominaciones también son aceptadas. Todas las personas que trabajan directa o indirectamente con animales de experimentación son elegibles a ser nominadas.

Los proyectos nominados deben referirse a actividades recientes y que hayan sido implementadas de manera efectiva. Los programas o actividades en fase de desarrollo deben esperar a ser presentados una vez se hayan obtenido información y resultados sobre su implementación.

Las nominaciones se presentan rellenando un formulario que debe incluir, entre otros, los siguientes puntos:

- Descripción de la actividad o proyecto.
- Justificación de cual o cuales de las 3Rs han sido implementadas en el proyecto.
- Descripción clara y concisa de los resultados en la implementación del proyecto (incluyendo las estadísticas apropiadas).
- Justificación de como la actividad o proyecto representa un avance nuevo y significativo, una implementación satisfactoria y una mejor comprensión de los principios de las 3Rs.

El formulario completo se debe enviar a través de la web interna de Zoetis, en la sección de "3Rs y Alternativas". La Junta de Bienestar Animal de Zoetis (Animal Welfare Board) está formada por un grupo de expertos con una amplia experiencia en el campo de la investigación farmacéutica, y es la encargada de evaluar y elegir los proyectos finalistas y los ganadores una vez al año.

Los resultados de los premios a las 3Rs se presentan en una ceremonia durante la llamada "Semana del Bienestar Animal" que tiene lugar, generalmente, durante la primera semana de octubre, coincidiendo con el día mundial de los animales que se celebra cada año el día 4 de octubre.

Durante toda la semana se presentan los distintos proyectos presentados a los premios en forma de pósteres y tienen lugar numerosas actividades, reuniones y presentaciones de los distintos grupos que forman parte de la estructura global de Bienestar Animal de Zoetis.

En la ceremonia, la máxima autoridad en bienestar animal de Zoetis explica, brevemente, todos los proyectos presentados, así como las personas y/o grupos nominados alrededor del mundo y hace entrega a todos los participantes en el programa de un diploma honorífico de reconocimiento. Los responsables de los proyectos ganadores reciben además un diploma de excelencia y un premio de cristal (ver Figura 1).



Figura 1.- Premio de cristal entregado a los proyectos ganadores.

El reconocimiento a todos los participantes en el programa de las 3Rs se distribuye de manera global por todos los canales internos de noticias de Zoetis. La ceremonia de entrega de premios es grabada y puede ser reproducida íntegramente durante un largo período de tiempo desde la web de Zoetis. Los proyectos se comparten entre los diferentes grupos y foros alrededor del mundo, así como el avance que suponen en la aplicación de las 3Rs y en la promoción del bienestar animal es aplicado, siempre que es posible, a nivel global.

En los últimos 6 años (desde la creación de Zoetis) se han presentado al programa una media de 21 nominaciones anuales, de las cuales el 7% han implementado proyectos de reemplazo en el uso de los animales por métodos alternativos, el 27% han significado una reducción en el número de animales utilizados, y el 33% han introducido mejoras significativas en el bienestar de los animales refinando protocolos de supervisión, introduciendo mejoras... (ver Figura 2).

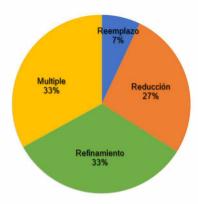


Imagen suministrada por la autoría

Figura 2.- Porcentaje medio de nominaciones por categorías (del 2014 al 2019)

### PROYECTOS 3Rs NOMINADOS

Los proyectos nominados son muy diversos, provienen de todas las plantas del mundo, y aplican a los diferentes campos de trabajo y especies animales con las que se trabaja en cada centro. A modo de ejemplo dentro de los diferentes proyectos en los que han trabajado y siguen trabajando los diferentes grupos de Zoetis, se puede destacar dentro del marco de la Reducción el trabajo activo que se ha realizado y se sigue realizando con las autoridades regulatorias para:

- Validar la utilización de un número, significativamente, inferior de animales en las pruebas clínicas necesarias en la fase final del desarrollo de las vacunas destinadas al ganado porcino y bovino.
- Eliminar la necesidad de realizar estudios adicionales de apoyo a los requerimientos de marketing con el fin de ampliar las indicaciones de usos de productos ya registrados.
- Aprobar el análisis de datos retrospectivos, obtenidos en estudios realizados previamente, como soporte para el mantenimiento de los registros de vacunas aviares, evitando así realizar nuevos estudios en animales.

Dentro del marco del Reemplazo, un grupo ha conseguido desarrollar, validar y registrar un método de potencia *in vitro* para la liberación al mercado de una vacuna frente a una de las enfermedades principales del ganado porcino en el mundo. El uso de esta nueva técnica evita además la gran variabilidad de

resultados que se obtenía en el estudio *in vivo*, con el consecuente riesgo de repetición de estudios y mayor uso de animales, a su vez proporcionando una mayor fiabilidad. Este reemplazo ha supuesto una reducción aproximada en el uso de 1.125 ratones anuales sólo en Europa.

Dentro del marco del Refinamiento numerosos grupos de Zoetis han desarrollado proyectos en los últimos años. Entre ellos destacan los proyectos de formación en técnicas de manipulación más humanas y seguras para las personas que trabajan con animales agrícolas de gran tamaño, que ha realizado un grupo de personal técnico comercial a numerosos granjeros en Estados Unidos. Asimismo, y también dentro del campo de la formación, el equipo global de bienestar animal ha editado videos muy completos para la formación continuada del personal, donde se muestran las técnicas de manipulación, dentro de los diferentes procedimientos, de manera humana y segura, de las especies bovina y felina.

Dentro de los proyectos de Refinamiento, destaca también el trabajo que se ha realizado en la aplicación de protocolos de supervisión y de establecimiento de criterios de punto final adecuados dentro de los proyectos; incrementando, significativamente, el número de observaciones realizadas a los animales después de una infección experimental por ejemplo, y aplicando criterios que permitan una intervención temprana en los animales a fin de evitar al máximo su dolor y sufrimiento en el curso de la enfermedad.

Igualmente, durante los últimos años se han presentado numerosos proyectos de mejora de las instalaciones y de las condiciones de alojamiento de los animales. Por ejemplo, unos proyectos de gran éxito han sido el alojamiento de los conejos y hámsteres en grupos sociales. Así en el año 2013, y con el objetivo de dar a los conejos la oportunidad de expresar su patrón de comportamiento más natural bajo condiciones experimentales, todas las jaulas fueron reemplazadas por salas donde los animales se alojan en grupos de unas 15-20 hembras directamente en el suelo (ver Figura 3). Se provee a los animales de lecho, de tubos y zonas más oscuras donde esconderse, tarimas donde poder subir y bajar, bastones de madera y otros juguetes naturales para estimular su hábito natural de roer. El resultado de este proyecto ha sido muy satisfactorio, los animales no presentan comportamientos agresivos y son mucho más dóciles y fáciles de manipular por las personas que los cuidan y que realizan los procedimientos experimentales con ellos.

### Panorama



Imagen suministrada por la autoría

Figura 3.- Alojamiento de conejos en grupos sociales.

Tras el éxito de este proyecto, en el año 2018 siguiendo el mismo modelo, las jaulas de hámsteres se substituyeron por recintos para el alojamiento en grupo de hasta 10 hámsteres hembras. Cada uno de estos recintos se provee de lecho, material para la formación de nido, tubos y zonas oscuras donde esconderse, plataformas donde poder subir y una rueda de ejercicio (ver Figura 4). El resultado de este innovador proyecto fue de nuevo muy satisfactorio, los animales en este modelo de alojamiento exhiben el comportamiento natural para la especie, son fáciles de manipular y en muy raras ocasiones presentan comportamientos agresivos frente a otros animales del grupo.



Imagen suministrada por la autorí

Figura 4.- Alojamiento de hámsteres en grupos sociales.

Otro proyecto con gran repercusión sobre la mejora de las condiciones de estabulación y del bienestar de los animales ha sido el diseño e instalación de los paneles de control de la luz en las llamadas "instalaciones flexibles", estas son instalaciones no destinadas al alojamiento de una especie en concreto, sino donde se trabaja con diferentes especies según los estudios que se deban llevar a cabo, para ello se adaptan constantemente de una especie a otra.

La adaptación para el alojamiento de una especie no sólo implica los cambios estructurales en la instalación sino también el ajuste de las condiciones y requerimientos ambientales óptimos para la misma. Para facilitar la provisión de estas necesidades ambientales, un equipo multidisciplinar de Zoetis, formado por personal de dirección del animalario y personal del departamento

de mantenimiento, desarrolló durante el año 2018 un sistema de control de la intensidad de la luz durante los ciclos de día y de noche, así como de control del ciclo de amanecer y de anochecer mimetizando los ciclos en condiciones naturales (ver Figura 5). El sistema permite establecer y grabar, para un futuro uso, múltiples programas lumínicos establecidos para cada especie, raza, edad y estado fisiológico. El dispositivo dispone también de un mecanismo de seguridad que evita que los programas puedan ser manipulados por usuarios que no dispongan de los debidos permisos.



Imagen suministrada por la autoría

Figura 5.- Pantalla principal del sistema de control lumínico.

### LA CUARTA R

En los últimos años, se ha empezado a incluir dentro del Programa de premios a las 3Rs la llamada cuarta R (*Rehoming and Rehabilitation*.

Dentro de la cuarta R se incluyen todos aquellos proyectos que desarrollan o introducen mejoras en las políticas de adopción, donación y rehabilitación de animales previamente utilizados en estudios experimentales. La instauración de estas políticas en los animalarios tiene un gran impacto emocional positivo en las personas que trabajan con los animales.

Zoetis goza ya de una larga lista de animales, incluyendo perros, gatos y caballos, que han sido adoptados, siempre asegurando que todo el proceso y su seguimiento se realizan con las máximas garantías de éxito para ambos, las familias adoptivas y nuestros animales.

### **BIBLIOGRAFÍA**

- Russell W.M.S. and Burch R. *The Principles of Humane Experimental Technique*. 1959. London, UK. Methuen.
- Zoetis, Animal Care and Welfare Corporate Policy.

# RED

# WASHERS

¡DESCUBRE TU NUEVA ZONA DE LAVADO!



- MAYOR RENDIMIENTO Y PRODUCTIVIDAD
  - MAYOR FLEXIBILIDAD Y FACILIDAD DE USO
    - MAYOR ADECUACIÓN DEL ESPACIO OPERATIVO
      - MAYOR AHORRO DE CONSUMOS EN SUMINISTROS



representado por

**evenue** matachana | +50 | Experience that improves lives | YEARS



### Just What You'd Expect from a Solutions Provider.



Washing & Contamination Control Systems for Laboratory Animal Science.

Allentown is proud to introduce our newest line of Washing & Contamination Control Systems for the Laboratory Animal Science Industry! As an end-to-end Solutions Provider, dedicated to fulfilling the needs of all segments of our industry, these new solutions have been designed and engineered to provide the highest levels of efficiency and flexibility available on the market today. Our current line of Washing & Contamination Control products includes:

Cabinet Washers / Rack Washers / Tunnel Washers / Air Showers / Decontamination Chambers Transfer Stations / Pass-Through Boxes / Bottle Processing Equipment



# Actividad inesperada de Cre en tejido germinal y durante el desarrollo embrionario

### Carme Cucarella

Servicio de transgénesis y biotecnología reproductiva IBV-CSIC

### INTRODUCCIÓN

El sistema Cre/loxP revolucionó la investigación biomédica al permitir modificar la expresión génica de una manera específica en determinadas células/tejidos, a diferencia de los primeros ratones modificados genéticamente en los que la inactivación de un gen se producía en todas las células del organismo. La enzima Cre cataliza la reacción de recombinación entre dos elementos loxP (secuencias cortas de 34 nucleótidos), produciendo la excisión de la región genómica flanqueada por dichos sitios. De esta manera, cuando se cruza un ratón que expresa Cre bajo un promotor específico de tejido con otro ratón que contiene un gen floxeado (es decir, un gen con un exón crítico flanqueado por dos loxP intrónicos), se obtendrá un individuo knock-out (KO) condicional que expresará el gen en todo el organismo excepto en aquellas células que estén expresando Cre, en las que se habrá producido la recombinación y por tanto el gen habrá quedado inactivado.

El éxito de la herramienta Cre/loxP depende en gran medida de que el patrón de expresión de la recombinasa Cre sea el esperado, es decir, que Cre esté presente en cantidad suficiente en el tejido diana y ausente en el resto de los tejidos. Sin embargo, esto no siempre es así y en numerosas ocasiones encontramos patrones de expresión sorprendentes.

### CAUSAS DE LA EXPRESIÓN INESPERADA DE CRE

### Debido a la expresión ectópica del promotor utilizado

Ocurre sobre todo en líneas Cre obtenidas por transgénesis clásica, es decir, por microinyección pronuclear de DNA en zigotos. Tras la microinyección, el transgén se integra al azar en cualquier punto del genoma, pudiendo verse afectado por el ambiente genético en el que se ha integrado. Además, por motivos técnicos, en muchos casos se usan promotores mínimos que no incluyen todos los elementos reguladores necesarios para

reproducir con fidelidad el patrón de expresión fisiológico.

Como la integración del transgén es aleatoria y distinta en cada zigoto, puede darse el caso que animales con el mismo transgén, pero procedentes de eventos de integración independientes, tengan patrones de expresión distintos, afectándose tanto la cantidad de proteína Cre presente como la especificidad de la expresión.

### Debido a la expresión endógena del promotor

En algunos casos la actividad inesperada de Cre no es ectópica sino que reproduce fielmente el patrón de expresión del promotor utilizado. Algunos promotores son activos en tejidos distintos al diana aunque sea sólo de forma temporal. Una expresión breve puede ser difícil de detectar (y por lo tanto puede que no haya sido descrita en la literatura), pero tiene importantes repercusiones porque el efecto de la recombinación es irreversible y, como consecuencia, permanente.

Esta es la principal causa de actividad inesperada en líneas obtenidas por mutagénesis dirigida en células troncales embrionarias o por edición genética mediada por CRISPR/Cas9. Estas técnicas permiten controlar el punto de integración y, por lo tanto, permiten localizar Cre bajo la influencia del promotor endógeno deseado.

En el caso de los knock-in (KI) obtenidos por inserción de una unidad transcripcional (promotor + secuencia codificante) en un sitio seguro del genoma, por ejemplo el locus ROSA, estaríamos en una situación intermedia: el entorno de la inserción es conocido y ha sido comprobado en un gran número de líneas que no afecta significativamente a la expresión del transgén, pero el promotor puede presentar actividad ectópica por falta de algún elemento regulador importante.

### Reproducción y genética

En 2012 los laboratorios Jackson publicaron los resultados obtenidos en un esfuerzo por caracterizar las líneas Cre más frecuentemente solicitadas de una manera objetiva y sistemática<sup>1</sup>. Las conclusiones del estudio no dejan lugar a dudas. Además de detectar casos sorprendentes como la inconsistencia entre crías de la misma camada y que el origen paterno o materno de Cre puede condicionar el resultado, la principal conclusión del estudio fue que la presencia inesperada de Cre en distintos tejidos es relativamente frecuente.

En algunos casos que exista actividad recombinasa en tejidos distintos al diana, aun no siendo la situación ideal, podría ser asumible. Sin embargo, existen varios escenarios en los que este hecho puede tener consecuencias catastróficas para la validez del modelo experimental: cuando Cre se expresa durante los procesos de oogénesis o espermatogénesis, y cuando hay presencia de Cre en las primeras divisiones celulares una vez producida la fecundación. Ambos escenarios son similares, pero no totalmente equivalentes, como veremos con más detalle a continuación.

### CASO I: ACTIVIDAD RECOMBINASA EN PRECURSORES GERMINALES

Cuando Cre se expresa en el tejido germinal de uno de los progenitores y hay coexistencia de Cre y el alelo floxeado en dicho tejido, se puede producir recombinación del alelo floxeado antes de la fecundación, de manera que los animales originados a partir de los gametos recombinados poseerán en todas sus células un alelo delecionado en lugar del alelo floxeado esperado.

El porcentaje de células germinales precursoras en las que se

produce la recombinación depende de cada línea Cre. En algunos casos, la deleción germinal puede afectar al 100% de los gametos y, por lo tanto, toda la descendencia se verá afectada. En otros casos, la expresión de Cre es menor y sólo afecta a un porcentaje más o menos discreto, dando lugar a camadas en las que coexisten dos tipos de animales: aquellos animales que heredan el alelo floxeado y se comportan como knock-out condicionales junto con animales procedentes de gametos recombinados y que tienen el alelo delecionado en lugar del floxeado en todas sus células.

Para evitar la deleción germinal se recomienda que Cre y el gen floxeado se mantengan separados en líneas de ratones independientes, y que éstas sólo se crucen para obtener los sujetos de experimentación. De esta manera nunca coincidirán Cre y flox antes de la fecundación.

Sin embargo, este sistema de cruce solo permite obtener animales heterozigotos para ambos alelos, y en la práctica esto puede suponer una limitación importante. Por ejemplo, para conseguir knock-outs condicionales es necesario que el alelo floxeado esté en homozigosis, para que la recombinación se produzca en ambos alelos y haya pérdida total de la proteína en estudio. En ese caso, Cre y flox deben coincidir obligatoriamente, bien en las células germinales de la hembra o bien en las del macho.

La deleción germinal puede producirse exclusivamente en uno de los dos progenitores, o pueden estar afectados ambos sexos aunque con distinto grado de afectación. En la Tabla 1 se muestran algunas de las líneas de ratón en las que este fenómeno ha sido estudiado con cierto detalle.

**Tabla 1.-** Líneas de ratón Cre con actividad recombinasa en precursores germinales. Porcentaje de deleción germinal (entre paréntesis número de casos registrados sobre número total de animales testados, cuando se conocen los datos). n.c. no cuantificado; n.d. no determinado; \*Depende del gen floxeado con el que se cruza la línea Cre.

			Deleción germinal		
Nombre común	Nombre oficial	Principal tejido diana	Cre origen materno	Cre origen paterno	Referencias
AQP2-cre	Tg(Aqp2-cre)1Dek	riñón	0%	sí (n.c.)	nota en Jax (línea 006881)
CamKII-cre	Tg(CamK2a-cre)?	neuronas piramidales hipocampo	72-98%*	raro	Choi C 2014 <sup>2</sup>
CamKII-cre	Tg(CamK2a-cre)1Shn	neuronas piramidales hipocampo	100%	raro (n.c.)	com. personal Dr. C. Saura
cathepsin K-cre	Ctsk <sup>tm1(cre)Ska</sup>	osteoclasto	alto (n.c.)	alto (n.c.)	Winkeler, 2012 <sup>3</sup>
Dermo1-cre (Twist2-cre)	Twist2 <sup>tm1.1(cre)Dor</sup>	osteocblastos y condrocitos	0%	0-47%*	He, 2017 <sup>4</sup>
DAT-cre	Slc6a3 <sup>tm1(cre)Xz</sup>	neuronas dopaminérgicas	0%	ocasional (n.c.)	nota en Jax (línea 020080)
foxn1-cre	Foxn1tm3(cre)Nrm	keratinocitos y timo	0% (0 de 56)	100% (11 de 11)	Shi J, 2016 <sup>5</sup>
foxg1-Cre (BF1-Cre)	Foxg1 <sup>tm1(cre)Skm</sup>	telencéfalo	n.d.	69% (11 de 16)	Weng, 2008 <sup>6</sup>
hGFAP-Cre	Tg(GFAP-cre)25Mes	sistema nervioso central	50% (8 de 16)	17% (7 de 42)	Zhang, 2013 <sup>7</sup>

			Deleción germinal		
Nombre común	Nombre oficial	Principal tejido diana	Cre origen materno	Cre origen paterno	Referencias
keratinK5-Cre	Tg(KRT5-cre)5132Jlj	piel y epitelio estratificado	100%	0%	Ramirez, 2004 <sup>8</sup>
keratocan-cre	Tg(Kera-cre)KC4.3Wwk	keratocitos córnea	100% (20 de 20)	38-60%*	Weng, 2008 <sup>6</sup>
PB-Cre4	Tg(Pbsncre)4Prb	epitelio de próstata	100% (20 de 20)	0%	Birbach, 2013 <sup>9</sup>
Pvalb-2A-cre	Pvalb <sup>tm1.1(cre)Aibs</sup>	neuronas gabaérgicas PVA+	<5%	50-100%*	Kobayashi, 2013 <sup>10</sup>
Rgs9 cre	Rgs9 <sup>tm1(cre)Yql</sup>	neuronas estriado	93% (27 de 29)	14% (5 de 36)	Liput, 2018 <sup>11</sup>
SMMHC <sup>Cre/eEGP</sup>	Tg(Myh11-cre,-EFGP)2Mik	músculo liso, (miocitos vasculares)	100%	99,4%-100%*	nota en Jax (línea 007742), de Lange W.J., 2008 <sup>12</sup>
SynCre	Tg(Syn1-cre)671Jxm	cerebro	0% (0 de 26)	63% (26 de 40)	Rempe, 2006 <sup>13</sup>
ThIRESCre	Th <sup>tm1(cre)Te</sup>	células catecolaminérgicas	100%	<20%	Lindeberg, 2004 <sup>14</sup>
Tie2-cre	Tg(Tek-cre)12Flv	endotelio	100%	0%	de Lange, 2008 <sup>12</sup>
			Sin especificar origen Cre		
α-МуНС	Tg(aMyHC-Cre)1Sch	cardiomiocito	14,7% (21 de 142)		Eckardt, 2004 <sup>15</sup>
Emx1-cre	Tg(Emx1-cre)1lto	prosencéfalo	36%		Zeller, 2008 <sup>16</sup>
nestin-cre	Tg(Nes-cre)1Anl	sistema nervioso	28,6% (4 de 14)		Zhang, 2013 <sup>7</sup>
Pcp2-cre (L7Cre)	Tg(L7/Pcp2-Cre)1Mey	células de Purkinje	5%		Tsai, 2012 <sup>17</sup>
RIP-cre	Tg(Ins2-Cre)23Herr	células β pancreáticas	0,7%		Spinelli, 2015 <sup>18</sup>
Sertcre	Slc6a4tm1(cre)Xz	neuronas serotoninérgicas	100%		Lam DD, 2011 <sup>19</sup>

Imagen suministrada por la autoría

Cuando sólo uno de los sexos está afectado, el problema se puede evitar planteando una estrategia de cruce correcta, consistente en utilizar como portador de Cre exclusivamente el sexo no afectado. Cuando ambos sexos están afectados el problema no se puede eliminar completamente, pero al menos sí se puede minimizar escogiendo el progenitor que conlleva menor tasa de expresión germinal. Un caso extremo es la línea Cathepsin-cre, utilizada para producir mutantes condicionales en osteoclastos. En un estudio posterior<sup>3</sup>, se demostró que el promotor de catepsina endógeno es activo tanto en oocitos como en espermatozoides maduros, llegando los autores a cuestionar los resultados previos generados con esta línea y a sugerir la necesidad de buscar una alternativa para obtener modelos condicionales específicos de osteoclasto. No es un caso único, en la Tabla 1 se recogen otras líneas con expresión fuerte de Cre en los gametos de ambos sexos.

Un hecho que a priori puede sorprender es que la presencia del alelo recombinado es independiente de que el gameto resultante sea portador o no de Cre. Esto ocurre cuando Cre actúa en los precursores germinales diploides antes de completar la primera meiosis. Durante las divisiones posteriores, el gen (ya en su forma recombinada) y Cre pueden segregar, pudiendo ser heredados de forma independiente el uno del otro (ver Figura 1).

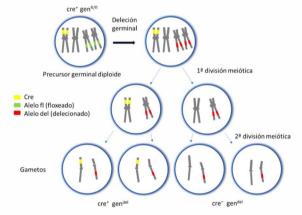


Imagen suministrada por la autoría

**Figura 1.-** La forma recombinada de un gen puede estar presente en gametos que no han heredado Cre.

### CASO II: CRE PRESENTE EN LOS GAMETOS CON RECOMBINACIÓN POST-FECUNDACIÓN

En el caso I hemos visto que la deleción germinal sólo puede producirse cuando coexisten Cre y el gen floxeado en el mismo progenitor. Sin embargo, se han documentado casos en los que se produce una recombinación global inesperada que afecta a todas las células de un organismo incluso aunque no exista coexistencia

### Reproducción y genética

de Cre y flox en las células germinales de los progenitores. Uno de los primeros casos descritos fue la línea CAG-cre<sup>20</sup>, pero el efecto se ha observado en otras líneas, tales como VASA-cre<sup>21</sup>, PB-Cre4<sup>9</sup>, Sox2cre<sup>22</sup>, Tie2 y SMMHC-cre<sup>12</sup> o K5Cre líneas 5132 y 4806<sup>8</sup>, siempre asociado a Cre de origen materno. El mecanismopropuesto en la mayoría de los casos es la persistencia en el citoplasma del oocito de Cre en forma de mRNA o proteína (esto último se ha demostrado mediante inmunofluorescencia).

Este fenómeno se produce casi exclusivamente en Cre de origen materno por las características especiales de la oogénesis. Durante la formación del oocito, las divisiones son asimétricas y el oocito maduro retiene casi todo el contenido citoplasmático de la célula precursora. Además, se ha comprobado que tras la fecundación el embrión utiliza casi exclusivamente los mRNAs y proteínas acumulados en el oocito, mientras que la contribución paterna se ciñe al aporte de contenido genético<sup>23</sup>. A pesar de ello, existe un ejemplo de recombinación post-fecundación en Cre de origen paterno. Según la información que acompaña la descripción de las líneas Jax 006954 y 018980 (ratones VASA-cre de distinto fondo genético), se ha detectado este efecto también a partir de los espermatozoides, aunque es un evento raro, de naturaleza desconocida, que solamente aparece al cruzar con determinadas líneas floxeadas y sobre todo afecta a machos de una cierta edad.

Como ocurre en el caso I, este efecto es independiente de que el embrión resultante sea portador o no de Cre.

El porcentaje de embriones afectados depende de cada línea, variando desde ser un evento poco frecuente a afectar a la totalidad de la descendencia, como ocurre con la línea CAG-Cre citada anteriormente.

Otra cuestión distinta es el porcentaje de células afectadas. En el caso I la deleción está presente en la totalidad de las células de los individuos afectados porque la recombinación tiene lugar antes de la fecundación. Sin embargo, en las líneas que se han descrito en el caso II puede que la recombinación no afecte al 100% de las células. Podría ocurrir que, aunque Cre esté presente en el oocito, la recombinación no fuera inmediata tras la fecundación. En ocasiones la actividad se retrasa y afecta sólo a uno de los blastómeros del embrión. En ese caso, obtendremos individuos mosaicos en los que se observará un patrón parcheado, con células afectadas formando islotes en todos los tejidos. El porcentaje de células afectadas puede ser variable incluso entre individuos de la misma camada. Andreas Birbach

cuantificó el número de células positivas para GFP en las crías procedentes de cruces entre hembras PB-Cre4 y machos *reporter* CAG-LSL-GFP. De los 15 animales analizados, 3 expresaban GFP sólo en 1-20% de las células estudiadas, otros 5 tenían el 20-40% de células afectadas, 4 expresaban GFP en el 40-60% de sus células y sólo 2 tenían GFP en el 100% de sus células.

### CASO III: EXPRESIÓN DE CRE DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO

Durante el desarrollo embrionario, muchos promotores se expresan de manera transitoria en localizaciones distintas de su patrón de expresión definitivo en tejido adulto. Como ya hemos comentado, debido a la irreversibilidad de la recombinación, esta actividad fugaz de Cre quedará fijada de forma permanente, provocando la presencia de alelos recombinados en tipos celulares inesperados.

En cuanto al porcentaje de células afectadas por la recombinación, dependerá del estadío embrionario en el que se activa la recombinasa. Cuanto más temprana sea la expresión de Cre (por ejemplo en las primeras divisiones), mayor será el número de células y/o tejidos afectados. Esta deleción inespecífica parcial coexistirá con la deleción correcta en el tejido diana, y a diferencia de los casos I y II, este efecto sólo afectará a animales Cre positivos.

Curiosamente, el patrón de recombinación también puede verse afectado por el origen paterno o materno de Cre. Es el caso de la línea Ella-cre (Tg(Ella-cre)C5379Lmgd), una línea muy utilizada que expresa Cre en los primeros estadíos embrionarios. Cuando se cruza una hembra Ella-cre con un macho R26R-lacZ, la descendencia presenta actividad galactosidasa intensa en todos los tejidos analizados. Cuando el sexo de los progenitores se invierte, existe actividad en todos los tejidos, pero limitada a unas pocas células (patrón parcheado) debido posiblemente a un retraso en la actividad Cre durante las primeras divisiones del embrión¹.

Una activación transitoria de un promotor en algún momento del desarrollo embrionario es la causa de recombinación inesperada en células que comparten precursores comunes. Por ejemplo, la proteína ácida fibrilar de glía (GAFP) se utiliza rutinariamente como marcador específico de glía porque en tejido adulto se expresa fuertemente en astrocitos y no en neuronas. Sin embargo, durante el desarrollo este promotor es activo en células no gliales, incluyendo un amplio rango de progenitores neuronales, lo que invalida el uso de GFAP-cre para

conseguir KO condicionales de glía. Esto mismo ocurre en otros promotores<sup>24</sup>.

Por último, es importante destacar que los casos I, II y III no son excluyentes y podrían producirse simultáneamente, complicando aún más la interpretación de los resultados obtenidos.

#### DISCUSIÓN

La herramienta Cre/Lox ha revolucionado el campo de la investigación biomédica y su utilidad es incuestionable. Sin embargo, para hacer un buen uso de ella hay que conocer todos los posibles problemas que pueden aparecer con el fin de detectarlos mediante los controles adecuados y evitarlos en lo posible.

Es muy recomendable hacer una buena revisión de los trabajos publicados en los que se haya usado la línea Cre que nos interesa. En la base de datos de Jax (www.informatics.jax.org/home/recombinase) podemos encontrar información muy útil, tanto del artículo original en el que se describe por primera vez la línea, como un listado de referencias en las que se ha utilizado esa línea en concreto, algo que no siempre es sencillo haciendo una búsqueda bibliográfica habitual, porque existe cierta duplicidad en los nombre de las líneas Cre. Además, en la descripción de la línea pueden aparecer anotaciones no publicadas acerca de su uso y el sistema de cruce óptimo.

Cuanto más utilizada haya sido una línea Cre, más probabilidades hay de que este tipo de actividades inesperadas hayan sido descritas con anterioridad. Sin embargo, la ausencia de problemas reportados no siempre es garantía de que no los vayamos a encontrar en nuestro sistema. La mayoría de las líneas que aparecen en la Tabla 1 son de uso frecuente, pero en algunos casos los problemas tardaron años en detectarse.

¿Cómo pudo haber pasado desapercibido un fenómeno tan grave como la recombinación inespecífica en todas las células del organismo? Una posible explicación es que el efecto no se detectara simplemente porque no se había previsto, y por lo tanto no se habían realizado los controles pertinentes. En algunos casos las alarmas saltaron cuando empezaron a aparecer casos de genotipos inexplicables a partir de los genotipos de los progenitores. En otros casos el detonante es la aparición de fenotipos inesperados, mayoritariamente asociados a la expresión generalizada de genes indicadores fácilmente

detectables, como por ejemplo GFP, o con fenotipos llamativos, como por ejemplo el aumento de la aparición de tumores por inactivación de un gen supresor como el Pten.

Sin embargo, en la mayoría de los casos el fenotipo por recombinación global no es tan evidente y por eso puede pasar desapercibido si no se incluyen los controles adecuados. Desde hace algunos años, son muchas las voces que inciden en la necesidad de incluir la detección sistemática del alelo recombinado como parte de la estrategia general de genotipado, tal y como Song y Palmiter recogen en una excelente revisión sobre el uso del sistema Cre/loxP<sup>25</sup>.

Otra posibilidad es que el efecto inespecífico no haya sido descrito con anterioridad, simplemente, porque no se haya dado el caso. La eficiencia de la recombinación mediada por Cre no es igual para todos los elementos loxP. Desde hace tiempo se sabe que la tasa de recombinación es inversamente proporcional a la distancia que separa los dos loxP. Otros factores que pueden condicionar la eficiencia son la configuración genética del locus en donde se sitúan los loxP, las secuencias inmediatamente adyacentes a ellos e incluso el estado de metilación. Por tanto, podría darse el caso que la especificidad sea perfecta para una combinación Cre/loxP concreta, pero aparezca actividad inesperada cuando la misma línea Cre se cruza con otro gen floxeado más accesible.

#### PAUTAS A SEGUIR PARA EVITAR EFECTOS INESPERADOS

- 1. Mantener las líneas Cre y flox por separado siempre que se pueda.
- Incluir la detección del alelo recombinado en el genotipado de todos los animales.
- Revisar la bibliografía y la información contenida en bases de datos de líneas Cre.
- 4. Plantear una buena estrategia de cruce basándose en información previa sobre la línea Cre y llevar un registro sistemático de los cruces para poder rastrear las causas si aparecen efectos inesperados. Esta información debería incluirse en la sección de materiales y métodos de los artículos.

# Reproducción y genética

Por último, otro factor para tener en cuenta es que la caracterización inicial de las líneas Cre recién creadas, que se suele realizar en la descendencia del cruce con una línea reporter (p. Ej. un animal Cre+ con un animal reporter (p. Ej. un animal Cre+ con un animal reporter (p. Ej. un anima que se utilizó en el estudio de los laboratorios Jax, no existe coexistencia de Cre con el gen floxeado en las células germinales y por lo tanto fallará en la detección de casos de deleción germinal (caso I). Una estrategia más adecuada (aunque más laboriosa porque necesita una generación extra), sería plantear cruces en los que uno de los progenitores posea tanto Cre como el gen floxeado, alternando además el sexo de los progenitores.

#### **BIBLIOGRAFÍA**

- Heffner C.S., Herbert Pratt C., Babiuk R.P., et al. Supporting conditional mouse mutagenesis with a comprehensive cre characterization resource. Nat Commun. 2012;3:1218.
- 2. Choi C.I., Yoon S.P., Choi J.M., et al. Simultaneous deletion of floxed genes mediated by CaMKIla-Cre in the brain and in male germ cells: application to conditional and conventional disruption of Goa. Experimental & Molecular Medicine. 2014:46:e93.
- 3. Winkeler C.L., Kladney R.D., Maggi Jr. L.B., et al. Cathepsin K-Cre Causes Unexpected Germline Deletion of Genes in Mice. PLoS One. 2012;7(7):e42005.
- 4. He Y., Sun X., Wang L., et al. Male germline recombination of a conditional allele by the widely used Dermo1-cre (Twist2-cre) transgene. Genesis. 2017;55(9):e23048.
- 5. Shi J., Getun I., Torres B., et al. Foxn1[Cre] Expression in the male germline. PLoS One. 2016;11(11):e0166967.
- Weng D.Y., Zhang Y., Hayashi Y., et al. Promiscuous recombination of LoxP alleles during gametogenesis in cornea Cre driver mice. Mol Vis. 2008;(14):562-71.
- Zhang J., Dublin P., Griemsmann S., et al. Germ-Line Recombination Activity of the Widely Used hGFAP-Cre and Nestin-Cre Transgenes. PLoS One. 2013;8(12):e82818.
- 8. Ramirez A., Page A., Gandarillas A., et al. A keratin K5Cre transgenic line appropriate for tissue-specific or generalized Cre-mediated recombination. Genesis. 2004;39(1):52-7.
- 9. Birbach A. *Use of PB-Cre4 Mice for Mosaic Gene Deletion*. PLoS One. 2013;8(1):e53501.
- 10. Kobayashi Y. and Hensch T.K. Germline recombination by conditional gene targeting with Parvalbumin-Cre lines. Front. Neural Circuits. 2013;7:168.

- 11. Liput D.J. Cre-recombinase dependent germline deletion of a conditional allele in the Rqs9cre mouse line. Front, Neural Circuits. 2018;12:68.
- 12. de Lange W.J., Halabi C.M., Beyer A.M., et al. Germ line activation of the Tie2 and SMMHC promoters causes noncell-specific deletion of floxed alleles. Physiol Genomics. 2008;35(1):1-4.
- Rempe D., Vangeison G., Hamilton J., et al. Synapsin I Cre transgene expression in male mice produces germline recombination in progeny. Genesis. 2006;44(1):44-9.
- Lindeberg J., Usoskin D., Bengtsson H., et al. Transgenic expression of Cre recombinase from the tyrosine hydroxylase locus. Genesis. 2004;40(2):67-73
- 15. Eckardt D., Theis M., Döring B., et al. Spontaneous ectopic recombination in cell-type-specific Cre mice removes loxP-flanked marker cassettes in vivo. Genesis. 2004;38(4):159-65.
- Zeller A., Crestani F., Camenisch I., et al. Cortical glutamatergic neurons mediate the motor sedative action of diazepam. Molecular Pharmacology. 2008;73(2):282-91.
- 17. Tsai P.T., Hull C., Chu Y.X., et al. Autistic-like behavior and cerebellar dysfunction in Purkinje cell Tsc1 mutant mice. Nature. 2012;488:647-51.
- Spinelli V., Martin C., Dorchies E., et al. Screening strategy to generate cell specific recombination: a case report with the RIP-Cre mice. Transgenic Res. 2015;24(5):803-12.
- Lam D.D., Leinninger G.M., Louis G.W., et al. Leptin Does Not Directly Affect CNS Serotonin Neurons to InfluenceAppetite. Cell Metabolism. 2011;13(5) 584-91.
- 20. Sakai K. and Miyazaki Ji. A transgenic mouse line that retains cre recombinase activity in mature oocytes irrespective of the cre transgene transmission. Biochem Biophys Res Commun. 1997;237(2):318-24.
- 21. Gallardo T., Shirley L., John G.B., et al. Generation of a germ cell-specific mouse transgenic Creline, Vasa-Cre. Genesis. 2007;45(6):413-7.
- 22. Hayashi S., Tenzen T., and McMahon A.P. *Maternal inheritance of Cre activity in a Sox2Cre deleter strain*. Genesis. 2003;37(2):51-3.
- 23. Bianchi E. and Sette C. Post-transcriptional control of gene expression in mouse early embryo development: a view from the tip of the iceberg. Genes. 2011;2(2):345-59.
- Morrison C.D. and Münzberg H. Capricious Cre: the devil is in the details. Endocrinology. 2012;153(3):1005-7.
- 25. Song A.J. and Palmiter R.D. *Detecting and avoiding problems when using the Cre-lox system*. Trends Genet. 2018;34(5):333-40.





# ¡LA GENTE HABLA DE NEXGEN!

La gente habla de NexGen, ¡y lo que cuentan es maravilloso! Cuando comercializamos NexGen, nuestro objetivo era garantizar que se tratara del sistema de jaulas ventiladas individualmente (IVC) más ligero, rentable y fácil de usar del sector de los sistemas de laboratorio automatizados (LAS). Y por los comentarios que nos llegan, ¡lo conseguimos! De hecho, todo este buen feedback es el motivo por el cual llamamos "Easy IVC" a NexGen.



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



#### INSTRUMENTACIÓN E INSTALACIONES CIENTÍFICAS



Sistemas de descontaminación mediante peróxido de hidrógeno vaporizado registrado por la EPA y compatible con BPR, para proporcionar una reducción de patógenos de 6-Log, consistente y compatible con GMP para todos sus equipos y espacios.



**Bioquell BQ50** 

Generador móvil y robusto.

automáticos,

#### SAS Biológico

Con GVPH L - 4 de Bioquell se consigue una reducción de patógenos de 6Llog en todas las superficies de la cámara y de la carga.

**Bioquell L-4** 

Generador de VPH móvil. Ideal

para salas, aisladores, RABS,



#### SAS Ventilado

Diferentes dimensiones según necesidad de la instalación con KIT de conexión a GVPH L-4 de Bioquell.



**Bioquell IG-2** 

Solución integrada con su

equipo y proceso operativo.

Descontaminación rápida y efectiva de salas. Móvil, escalable y compatible con tecnología de comunicación inalámbrica.

**Bioquell ProteQ** 



Sistema fijo montado en pared.



Resultados

rápidos y probados.

#### **Bioquell SeQure**



#### **Asilador Qube**

Espacio de trabajo aséptico y personalizable **GPHV** con integrado.











**MMM Group** 

bmt@bmtiberia.es www.bmtiberia.es









# Protocolo anestésico en modelo porcino de cirugía laparoscópica para un modelo de entrenamiento en ginecología avanzada

Marisa Bernad, Cristina Pastor, Aurora García, Ricardo Pérez, Luis Mógica, Alicia Arnal y JavierGómez-Arrue

Servicio de Cirugía Experimental. Centro de Investigación Biomédica de Aragón

#### INTRODUCCIÓN

El objetivo de este artículo es explicar un protocolo de anestesia y analgesia apropiado para un modelo de entrenamiento de cirugía laparoscópica ginecológica en animal de experimentación, específicamente en cerdo.

La cirugía laparoscópica es una técnica especializada "mínimamente invasiva" que, a diferencia de la cirugía abierta tradicional, realiza pequeñas incisiones por las que se introduce el instrumental necesario para el desarrollo del procedimiento propuesto. Para realizar esta técnica es necesario un adiestramiento previo mediante pelvitrainers o simuladores laparoscópicos sobre patrones experimentales como el látex o tejidos orgánicos, siendo muy útiles estos dispositivos para adquirir la habilidad quirúrgica necesaria que permita efectuar las diferentes maniobras quirúrgicas entre las que destaca la sutura endoscópica como la de mayor complejidad técnica<sup>1</sup>. Una vez adquiridas dichas habilidades, en el modelo no biológico, se debe completar el entrenamiento realizando los procedimientos quirúrgicos en modelo de animal vivo.

# CONSIDERACIONES ANESTÉSICAS EN MODELOS LAPAROSCÓPICOS GINECOLÓGICOS

#### Consideraciones previas del paciente

Los animales utilizados en este modelo de entrenamiento son hembras de porcino de hasta 50 kg de peso (ver sección Animales). Antes de cualquier procedimiento anestésico debemos de comprobar que el animal presenta un buen estado de salud o en caso de modelos de enfermedad un estado general aceptable y estabilizado.

# Consideraciones del procedimiento quirúrgico que se va a realizar

Mediante este procedimiento se pretende mostrar el método para aprender, mantener o mejorar procedimientos quirúrgicos ginecológicos en un modelo animal a través de entrenamientos específicos cada vez con mayor nivel de dificultad, necesarios para el correcto desarrollo de la subespecialidad ginecológica en la que se trabaje: oncología, suelo pélvico y/o patología orgánica compleja. Las técnicas quirúrgicas a realizar y practicar en el modelo son: anexectomía, histerectomía radical, disección del retroperitoneo pélvico con linfadenectomía, colposacropexia, disección ureteral, disección del hilio renal (nefrectomía), manejo de complicaciones urológicas, manejo de complicaciones vasculares y hieroscopia. Por tanto, los aspectos que deberemos tener en cuenta antes de la anestesia serán los referidos a la cirugía en sí misma y las relativas a la realización del acto quirúrgico mediante laparoscopia.

Las consideraciones referidas al acto quirúrgico en sí principalmente serán la duración del procedimiento quirúrgico y el nivel de entrenamiento de la persona que lo realiza, el riesgo de hemorragias y el dolor quirúrgico provocado. Además, deberemos considerar aquellas debidas al procedimiento laparoscópico en sí. El cerdo, se colocará en la mesa de quirófano (ver Figura 1) en decúbito supino (dorsal), si bien, dependiendo de la técnica quirúrgica a realizar, será necesario emplear la posición de Trendelemburg para desplazar cranealmente el paquete intestinal.

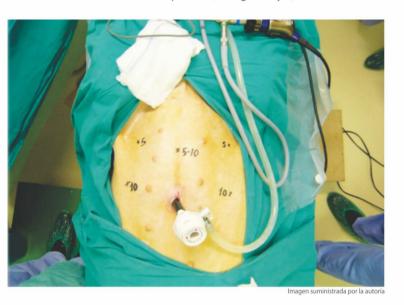


magen suministrada por la autoría

Figura 1.- Se puede apreciar al cerdo en la mesa quirúrgica durante el procedimiento quirúrgico.

# Anestesia y analgesia

El número y posición de los trócares dependerá del tipo de intervención a realizar, siendo la más frecuente la colocación de 4-5 trócares de los cuales uno se destinará a la óptica y los otros 3-4 para el instrumental. El número y diámetro de los trócares será: 1º y 2º de 10-11 mm uno en posición supraumbilical y el otro en el mismo ombligo; los restantes, 3º, 4º y 5º, con un diámetro de 5 mm, se colocarán en ambos flancos por fuera de las mamilas a la altura del ombligo, quedando el 5º colocado en el lado del cirujano, a unos 5 cm aproximadamente por debajo del trócar situado en el flanco superior<sup>2,3</sup> (ver Figuras 2 y 3).



**Figura 2.-** Detalle de la señalización para la colocación de trócares para la cirugía laparoscópica en una de las intervenciones.



Imagen suministrada por la au

Figura 3.- Colocación de los trócares durante una de las intervenciones.

Se procederá a generar un neumoperitoneo mediante la insuflación de CO<sub>2</sub> comenzando por 2 L/min y llegando a una presión no superior a 10-12 mm/Hg. Debemos anticipar las posibles complicaciones producidas por el neumoperitoneo, siendo la más frecuente el enfisema subcutáneo o mediastínico, que se produce cuando los trócares no atraviesan completamente las capas mucosas, muscular y peritoneal, ocasionando una disección entre las diversas capas. Otras posibles complicaciones, menos frecuentes, son el neumotórax, la hipoxemia, el embolismo por CO<sub>2</sub>, el colapso cardiovascular y las arritmias cardiacas<sup>4,5</sup>.

# Consideraciones para tener en cuenta en un procedimiento anestésico (cualquier anestesia con modelos porcinos)

Para la anestesia de estos animales tendremos presentes las posibles situaciones clínicas que se puedan plantear en cualquier anestesia general: la hipoventilación, la hipoxemia y la hipoxia, la hipotensión, la hipotermia y la bradicardia.

En el caso particular de la anestesia de cerdos siempre tendremos presente la posible aparición de hipertermia (maligna o no) y los signos clínicos que se producirán como consecuencia del aumento de la temperatura. Otra consideración para tener en cuenta es la dificultad para la intubación por diversos motivos: nivel de experiencia del anestesista; alteraciones morfológicas de las estructuras cervicales y laríngeas del animal; y la falta de recursos y equipamiento adecuados, como la pala del laringoscopio (longitud adecuada) o el diámetro y tipo del tubo para intubación endotraqueal. Siempre deberíamos anticipar posibles problemas y deberíamos de contar con alternativas a la intubación estandarizada en el centro. Tener a nuestra disposición un kit de urgencia de traqueotomía es una opción, pero tendremos que estar familiarizados con esta técnica, bien sea realizando una apertura de los anillos traqueales propiamente dichos, o por medio de una cricotiroidectomía.

#### PROTOCOLO ANESTÉSICO Y ANALGÉSICO (ver Tabla 1)

**Tabla 1.-** Resumen del protocolo anestésico y analgésico utilizado.

Protocolo anestésico y analgésico utilizado	
Preanestesia	Tiletamina-zolacepam (4 mg/kg; Zoletil®) + Dexmedetomidina (7,5 µg/kg; Dexdomitor®)
	IM.
Inducción anestésica	Propofol (1 mg/kg o a dosis efecto;     Propofol Lipuro 20 mg/ml).
	y/o inducción con mascarilla y sevoflurano     (3-4% vol; Sevorane®).

Protocolo anestésico y analgésico utilizado	
Mantenimiento anestésico	Sevoflurano al 1,9-2% vol.
Analgesia intraoperatoria	Fentanilo (bolo inicial 5 μg/kg + CRI 5 μg/kg/h; Fentanest®).
Fluidoterapia	Ringer Lactato y/o cloruro sódico 0,9% a 5-8 ml/kg/h.
Finalización procedimiento	Eutanasia (inyección de cloruro potásico intravenoso - dosis >1 mEq/kg).

Imagen suministrada por la autoría

#### **Animales**

Los animales utilizados en este modelo de entrenamiento son cerdos hembras (Sus scrofa), cruce comercial de razas híbridas x Pietrain, provenientes de integradoras que suministran animales no específicamente criados y destinados a experimentación animal. Estos cerdos suelen tener un peso corporal entre 35-50 kg. Tras ser recibidos y alojados en las instalaciones de cirugía experimental del CIBA (Centro de Investigación Biomédica de Aragón) los animales se someten a un periodo de aclimatación antes del procedimiento de al menos 7 días. Los animales son estabulados en boxes individuales de acuerdo con las medidas exigidas en el RD 53/2013 (medidas de 1340x1500x1100 mm; longitud x anchura x altura respectivamente). Dichos boxes son modulables pudiendo unirse entre sí para, en su caso, alojar animales agrupados. Siempre que sea posible se agruparán los cerdos del mismo proyecto, edad similar y día de procedimiento. En los boxes siempre se introducen elementos de enriquecimiento ambiental: botellas de plástico, pelotas de goma dura antiestrés, etc., para que puedan jugar. Los animales, durante el periodo de aclimatación, se alimentan con pienso compuesto granulado (P-08 GS, Agroveco) y agua ad libitum. El sistema de bebida es automático mediante chupetes.

#### Preanestesia

12 horas antes de comenzar el procedimiento anestésico se retira el pienso de los comederos permitiendo a los animales acceso ilimitado a la bebida. La premedicación se realiza mediante una inmovilización química por medio de una combinación de tiletamina-zolacepam (dosis 4 mg/Kg; Zoletil®) y dexmedetomidina (dosis 7,5 µg/kg; Dexdomitor®) administrada por vía intramuscular (IM). Actualmente, no usamos anticolinérgicos (p. Ej. atropina) en nuestros protocolos anestésicos puesto que el riesgo de secreciones tanto bronquiales como salivares en el cerdo es mínimo y, los efectos secundarios de la atropina no justifican en este modelo la necesidad de su utilización. Una vez inmovilizado químicamente el animal y transportado al área de quirófano procedemos a cateterizar una vena lateral de la oreja (ver Figura 4) al mismo tiempo que comenzamos la preoxigenación.



lmagen suministrada por la autoría

**Figura 4.-** Canulación de la vena lateral de la oreja para la administración de anestésicos y analgésicos.

#### Inducción anestésica

Después de 3 minutos realizando una preoxigenación con mascarilla, a 3 L/m de  $O_2$ , se procede a la intubación orotraqueal bajo la inmovilización química profunda, previamente realizada. En el caso de que sólo con la premedicación no se pueda realizar la intubación de los animales, utilizaremos propofol (dosis 1 mg/Kg vía intravenosa (IV) o a dosis efecto; Propofol Lipuro® 20 mg/mL) y/o inducción directa con mascarilla con sevoflurano (Sevorane® 3-4% vol; 100% líquido para inhalación del vapor).

#### Mantenimiento anestésico

El mantenimiento anestésico se realiza con sevoflurano al 1,9-2% vol. (vaporizador; módulo de dosificación DIVA con sistema de seguridad Quik Fil para Sevoflurano, Dräguer®) y mezcla de oxígeno-aire medicinal resultando en fracciones inspiratoria (Fi) de 75% de  $\rm O_2$ . La Fi que utilizamos en la anestesia de este modelo porcino es de 0,75 con el objetivo de reducir las atelectasias pulmonares.

#### Analgesia intraoperatoria

La analgesia para este modelo de entrenamiento se realiza mediante la administración de fentanilo, iniciándola con dosis inicial en bolo de 5  $\mu$ g/kg para seguir con una infusión continua (dosis 5  $\mu$ g/kg/h; Fentanest®) mediante bomba (Sistema de Bomba de jeringa de infusión Perfusor®Space, Braun) (ver Figura 5).

# Anestesia y analgesia



Imagen suministrada por la autoría

Figura 5.- Detalle de una de las bombas de Infusión utilizadas para administración defentanilo.

#### Ventilación mecánica

Todos los animales, de este modelo de entrenamiento, son mantenidos con ventilación controlada mecánica mediante un modo ventilatorio de volumen control y *autoflow* (modo ventilatorio CMV-AF; máquina ventilatoria Zeus, Infinity Empowered, Dräger®) y mediante un sistema reinhalatorio, circular y cerrado (ver Figura 5). Los parámetros prefijados inicialmente, para este modo de ventilación, corresponden a un volumen corriente (VT de 10-15 mL/kg) y una frecuencia respiratoria de 10-12 rpm. Se determina una presión límite de 20-30 cm H<sub>2</sub>O.

#### **Fluidoterapia**

La normovolemia se mantiene mediante fluidos administrando una solución de Ringer Lactato (Viaflo Hartmann Ringer lactada, Baxter) y/o cloruro sódico 0,9% (Viaflo cloruro sódico 0,9% solución para perfusión, Baxter) a un flujo de infusión de 5-8 ml/kg/h.

#### Monitorización anestésica

Se emplea un monitor multiparamétrico asociado al ventilador (monitor de la Zeus, Infinity C500 y C700; Dräger®). La monitorización cardiovascular se realiza mediante ECG de tres derivaciones, presiones arteriales no invasivas (NIBP), pulsioximetría y frecuencia de pulso. Se monitoriza la capnografía y los valores inspirados y espirados de CO<sub>2</sub> y agente anestésico inhalatorio. A nivel ventilatorio se monitorizan las curvas volumenpresión, flujo-tiempo, presión-tiempo, volumen-tiempo y, la temperatura mediante sonda de temperatura esofágica (ver Figuras 6 y 7). Además, se mantiene la temperatura corporal del animal utilizando una manta de agua circulante (T/Pump profesional Eickemeyer, Gaymar®).



**Figura 6.**- Monitorización hemodinámica y ventilatoria. Equipo de anestesia con máquina de anestesia, ventilador y monitor integrados. Modelo ZEUS Infinity Empowered (Drager®).



Figura 7- Detalle de la pantalla del monitor de seguimiento de datos hemodinámicos y respiratorios durante una de las intervenciones.

#### Finalización del procedimiento

Los animales utilizados para este modelo de entrenamiento entran dentro de los procedimientos a término y son eutanasiados de forma humanitaria al final del procedimiento. Para ello, y bajo un profundo nivel de anestesia, se administra una inyección de cloruro potásico intravenoso (dosis >1 mEq/kg) y se verifica bajo monitorización el cese de la actividad cardiovascular y respiratoria.

#### **AGRADECIMIENTOS**

A Javier Benito de la Víbora por su iniciativa y apoyo para la realización de este artículo. Y al equipo del Servicio de Cirugía Experimental del Centro de Investigación Biomédica de Aragón por su trabajo y accesibilidad para realizar este modelo laparoscópico en cerdo.

#### **BIBLIOGRAFÍA**

- 1. Bourdel N., Collins T., Pizarro D. et al. Augmented reality in gynecologic surgery: evaluation of potential benefits for myomectomy in an experimental uterine model. Surg Endosc. 2017;31(1):456-61.
- González Ramos P., Ibáñez Burillo P., and Gracia Colera D. Ejercicios de Adiestramiento en modelo animal: Ejercicios de adiestramiento en Cerda. Capítulo 6: 6.3.1, pag. 88-92. 2015. En Ginecología Laparoscópica en Modelos Animales Manual Práctico Edit: Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud. Editores: González Ramos P., y Pastor Oliver C. ISBN: 978-84-695-7727-1.
- 3. Gómez-Arrue J. and González Pastor C. *Anestesia y Analgesia de los distintos modelos animales: cerdo, conejo, rata*. Capítulo 4, pag. 47-54. 2015. En Ginecología Laparoscópica en Modelos Animales ⊠Manual Práctico⊠ Edit.: Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud. Editores: González Ramos P., y Pastor Oliver C.ISBN: 978-84-695-7727-1.
- 4. Ferrando C., Soro M., and Gutiérrez A. *Ventilación mecánica en cirugía abdominal laparoscópica*. Capítulo 47, pág. 759-72. 2018. En Apoyo respiratorio y Ventilación Mecánica en Anestesia y Cuidados Intensivos. Edit.: Aran. Editores: Belda J. y Ferrando C. ISBN: 978-84-17046-59-0.
- 5. Benito de la Víbora J., Arenillas M., and Gómez de Segura I.A. *Anestesia* en Cirugía Laparoscópica Experimental. Capítulo 3, pág. 37-43. 2004. En Manual de Cirugía Laparoscópica. Primera Edición. Edit.: Inputs Grafica. Editores: Jorge Berenguer. ISBN: 84-609-4804-8.



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

> ANÚNCIATE EN ANIMALES DE LABORATORIO.

> > LA REVISTA DE LA SECAL.

publicidad.revista@secal.es



### Bienestar animal

# El test de la natación forzada a debate

#### **Garikoitz Azkona Mendoza**

Departamento de Procesos Psicológicos Básicos y su Desarrollo. Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)

#### INTRODUCCIÓN

El uso de modelos animales ha permitido avanzar en la comprensión de la fisiología de diversas enfermedades humanas, y ha jugado un papel crítico en la evaluación de la eficacia y seguridad de nuevos tratamientos<sup>1</sup>.

Un modelo es una representación simple de un sistema complejo<sup>2</sup> y debe parecerse a la condición humana a estudiar en varios aspectos que incluyen (a) similitud en el perfil de signos (validez aparente), (b) mejora o atenuación de los mismos mediante tratamientos efectivos en los humanos (validez predictiva), (c) aparición de los signos mediante los mismos eventos que los provocan en los trastornos humanos (validez etiológica), e (d) implicación de procesos neuroquímicos similares (validez de constructo)<sup>3</sup>.

Se han generado numerosos modelos animales de depresión utilizando diferentes paradigmas. Algunos han utilizado variables orgánicas como la genética, la edad o el sexo, o variables experimentales tales como antecedentes o eventos de la vida temprana. Otros se han generado utilizando diversos paradigmas de estresores, como el tipo de estresor; estresores procesales versus sistémicos; o características del estresor; controlabilidad, previsibilidad, ambigüedad, cronicidad o intermitencia<sup>3</sup>.

A nivel conductual, la prueba más ampliamente utilizada en la fenotipación de modelos murinos de depresión ha sido el Test de la Natación Forzada (TNF). Este test se basa en la observación de que cuando un roedor se expone al agua, después de un comportamiento inicial intenso dirigido a escapar, como nadar y/o escalar, deja de luchar y muestra un comportamiento pasivo inmóvil (ver Figura 1). Se cree que la inmovilidad refleja la incapacidad de persistir en el comportamiento de escape después del estrés (es decir, la desesperación conductual) o el desarrollo de un comportamiento pasivo que desconecta al animal de las formas activas de afrontamiento del estrés.

A su vez, se ha demostrado que una amplia gama de tratamientos antidepresivos, entre ellos la fluoxetina, reducen el tiempo de inmovilidad, aumentando durante la prueba comportamientos de escape activo<sup>4</sup>.



**Figura 1.-** Conductas que presentan los roedores durante la realización del Test de la Natación Forzada. Adaptado de Nasi Medeot, 2017<sup>5</sup>

Sin embargo, hay autores que exponen que la inmovilidad no refleja depresión, sino que es una conducta adaptativa aprendida. Según este planteamiento, la fuerza impulsora detrás del cambio observado a la inmovilidad; es decir, de afrontamiento activo a pasivo, en el TNF no es la depresión o la desesperación, sino la cognición que promueve la adaptación conductual y la supervivencia. Así, el TNF puede usarse para diseccionar las vías moleculares y los circuitos neuronales que subyacen a la adquisición, retención y terminación de la respuesta de inmovilidad bajo las condiciones estresantes de natación forzada. Según estos autores utilizar el tiempo de inmovilidad es un modelo métrico antropomórfico e incorrecto<sup>6</sup>.

El grupo pro-derechos de los animales PETA (*People for the Ethical Treatment of Animals*) quiere que el Instituto Nacional de

## Bienestar animal

Otoño 2019. Número 83

Salud Mental (NIMH, del inglés *National Institute of Mental Health*) de los Estados Unidos deje de apoyar proyectos de investigación que utilicen el TNF. Sin embargo, desde el NIMH se sigue considerando que la prueba es crucial en ciertas investigaciones y seguirá financiando los proyectos. Aún y todo, la campaña de PETA encaja con la creciente preocupación de los científicos por la calidad de datos producidos por el TNF. De hecho, las principales compañías farmacéuticas como Roche, Janssen y AbbVie han dejado de utilizarlo<sup>7</sup>.

Actualmente, los investigadores se están planteando que el refinamiento en muchos experimentos se puede lograr desde un enfoque etológico del diseño y la realización de los experimentos<sup>2</sup>.

En este sentido el uso del Test de Preferencia de Sacarosa (TPS) parece una opción menos cruenta. Este test mide la anhedonia, que es la incapacidad de experimentar el placer de actividades gratificantes o agradables y es un síntoma central de la depresión en los humanos. El TPS está basado en un paradigma de elección de dos botellas, una con agua y otra con agua y sacarosa. Una reducción en la ingesta de sacarosa de los animales sometidos a estrés con el fin de provocar depresión indica anhedonia<sup>8</sup>.

#### **BIBLIOGRAFÍA**

- 1. Arakawa H. Ethological approach to social isolation effects in behavioral studies of laboratory rodents. Behav Brain Res. 2018;341:98-108.
- 2. Peters S. M., Pothuizen H.H., and Spruijt B.M. *Ethological concepts enhance the translational value of animal models*. Eur J Pharmacol. 2015;759:42-50.
- Anisman H. and Matheson K. Stress, depression, and anhedonia: caveats concerning animal models. Neurosci Biobehav Rev. 2005:29(4-5):525-46.
- 4. Slattery D.A. and Cryan J.F. *Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents*. Nat Protoc. 2012;7(6):1009-14.
- 5. Nasi Medeot L. Tesis doctoral: Hiponutrición perinatal y depresión: estudio de la reversion de las conductas depresivas facilitadas por la injuria nutricional temprana. 2017. Universidad Nacional de Córdoba.
- Molendijk M.L. and de Kloet E.R. Immobility in the forced swim test is adaptive and does not reflect depression. Psychoneuroendocrinology. 2015;62:389-91.

- 7. Reardon S. Depression researchers rethink popular mouse swim tests. Nature. 2019;571(7766):456-57.
- 8. Liu M.Y., Yin C.Y., Zhu L.J., et al. Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. Nat Proto. 2018;13(7):1686-98.



# Relación entre cortes histológicos e imágenes de resonancia magnética nuclear en cerebro adulto de ratón

#### Ana M. Santos<sup>1</sup>, Ana Fernández<sup>2</sup> y Ana Isabel Nieto<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Microscopía. Centro de Instrumentación Científica. Universidad de Granada <sup>2</sup>Unidad de Resonancia Magnética Nuclear Animal. Centro de Instrumentación Científica. Universidad de Granada <sup>3</sup>Unidad de Experimentación Animal. Centro de Instrumentación Científica. Universidad de Granada

#### INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso central (SNC), formado por la médula y el cerebro, supone uno de los grandes retos desde el punto de vista histológico por las grandes diferencias que existen entre las distintas especies. Además, muchas de las enfermedades neurológicas, así como sustancias tóxicas o ambientales, afectan a regiones neuroanatómicas concretas que deben de ser reconocidas y localizadas en los modelos utilizados, ya sean espontáneos, inducidos o modificados genéticamente. Como ejemplo, el Alzheimer afecta principalmente a la corteza cerebral mientras que en el Parkinson es la sustancia nigra, con lo que ambas zonas deben poder ser localizadas en cerebros de roedores, mucho más simples en cuanto a morfología y función que los humanos¹.

En este artículo, queremos hacer una descripción comparativa entre dos técnicas que se están utilizando en nuestras instalaciones de roedores para poner de manifiesto lesiones en el sistema nervioso central. En concreto, vamos a comparar varias secciones histológicas de cerebro de ratón con las imágenes obtenidas mediante resonancia magnética nuclear (RMN). Para ello, hemos elegido el corte axial, que es el más utilizado sobre todo en estudios de toxicología, y hemos optado por hacer secciones a cuatro niveles.

# RECOMENDACIONES PARA LA RECOGIDA, PROCESADO Y TALLADO DEL CEREBRO

El cerebro debe ser extraído lo más cuidadosamente posible una vez abierta la cavidad craneal para preservar la frágil consistencia de este tejido la conservación de las meninges puede ayudarnos a este propósito. Una vez fuera, la fijación se realiza por inmersión en un 10% de formalina tamponada.

Esta fijación permite conservar las estructuras cerebrales de una manera aceptable y supone un ahorro considerable de tiempo respecto a la fijación mediante perfusión, sobre todo si en el estudio se incluye un número de animales elevado. Recordemos que el volumen de fijador con respecto al volumen del tejido debe ser al menos 10:1 para que la fijación sea correcta. No obstante, si se van a realizar estudios de neurología más específicos puede ser necesario tener que optar por la perfusión, teniendo en cuenta la posibilidad de que puedan aparecer artefactos si no se realiza de una manera correcta<sup>2</sup>.

La formalina tamponada al 10% contiene aproximadamente un 3,7% de formaldehído y permite la realización de análisis de inmunohistoquímica, hibridación *in situ*, etc. En cambio, este medio suele contener alrededor de un 15% de metanol, pudiendo dar lugar a artefactos como la vacuolización de las células o la retracción vascular; circunstancias que no quitan su validez como fijador si el patólogo que realiza la valoración tiene experiencia en analizar el SNC. También se puede utilizar paraformaldehído (de mayor pureza al no contener metanol), pero cuya solución debe hacerse en el momento de utilizarse<sup>3</sup>.

Los tejidos deben fijarse al menos entre 18 y 24 horas antes de ser tallados. Sobre este tallado, en la mayoría de las instituciones se realizan entre 3 y 8 secciones, aunque en algunos casos llegan hasta 60. La recomendación de la *Society of Toxicology Pathology* es realizar al menos 7 secciones<sup>4</sup>. La orientación de los cortes suele ser axial (secciones transversales) incluyendo el cerebro completo. Los puntos en los que se realizan los cortes se toman teniendo en cuenta determinadas estructuras macroscópicas de la base del cerebro para conseguir que las secciones sean lo más

# Tinciones y tejido

homólogas posibles. En el caso de tener que realizar un elevado número de secciones, existen moldes para cerebro de rata y ratón que incluyen las cuchillas a una distancia prefijada.

En nuestro caso, hemos realizado 4 cortes que se han incluido en un solo casete de parafina, siguiendo recomendaciones para el tallado de tejidos publicadas previamente<sup>5</sup>. Consideramos que ésta podría ser la opción más utilizada de forma general en un centro de investigación a la hora de hacer un cribado de lesiones. Por otro lado, al incluir todo el cerebro en un bloque de parafina, si se sospecha la lesión en otras áreas, siempre se podrán hacer nuevos cortes de ese mismo bloque para poder visualizar regiones cerebrales intermedias.

El primer corte se realiza a nivel del quiasma del nervio óptico; el segundo, en la zona del hipocampo; el tercero, en la región del puente; y el cuarto, y último, en la mitad del cerebelo incluyendo también la médula oblongata (ver Figura 1). Los lóbulos olfatorios, por su fragilidad, suelen ser procesados *in situ* dentro de la cavidad craneal, sobre todo si la ruta de administración es la intranasal o inhalatoria.

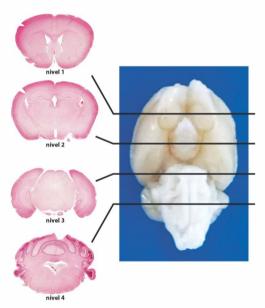


Imagen suministrada por la autoría

Figura 1.- Tallado del cerebro adulto de ratón. En la imagen de la derecha se muestra una visión ventral completa del órgano antes de realizar las cuatro secciones transversales indicadas mediante líneas horizontales en color negro. En la parte izquierda se muestran las secciones talladas tras su procesado histológico en nuestros cuatro niveles de estudio (modificado de Rao et al., 2014).

Posteriormente, las muestras siguen el procesado tradicional con inclusión en bloques de parafina, corte de secciones en microtomo a 4 micras, y tinción con hematoxilina-eosina para poner en evidencia la existencia o no de lesiones. También se pueden utilizar algunas tinciones histológicas específicas del SNC como el luxol fast-blue que nos permitiría ver la existencia de desmielinización, o, adicionalmente, un gran número de técnicas de inmunohistoquímica para diversos marcadores.

# IMÁGENES DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CEREBRO DE RATÓN

La imagen por resonancia magnética (IRM) es una técnica tomográfica basada en la resonancia magnética nuclear (RMN). En la actualidad, la IRM es una de las herramientas más potentes para el estudio *in vivo* de multitud de procesos fisiológicos y fisiopatológicos. Las principales ventajas que ofrece la IRM son la ausencia de efectos nocivos conocidos al no utilizar radiaciones ionizantes; la amplia versatilidad para el manejo del contraste (tanto intrínseco cómo extrínseco) y la capacidad multiplanar, pues permite la obtención de imágenes de planos en cualquier orientación espacial.

La RMN es un fenómeno físico por el cual los elementos que tengan momento magnético (propiedad cuántica intrínseca de los hadrones asociada a la capacidad de girar sobre sí mismo en torno a un eje) pueden absorber selectivamente energía de radiofrecuencias al ser colocados bajo un potente campo magnético. En teoría, se puede obtener una imagen por resonancia magnética de cualquier núcleo que tenga momento magnético nuclear o "espín"; sin embargo, en IRM de sistemas biológicos, el núcleo de interés es generalmente el núcleo de hidrógeno (¹H) debido a su abundancia natural.

Si consideramos la muestra, en nuestro caso un ratón, con un número N de protones donde todos ellos están orientados aleatoriamente en todas las direcciones, no observaremos una magnetización neta. En cambio, cuando el ratón se coloca en el seno de un potente campo magnético, los espines orientados paralelamente a él estarán en un estado de mayor energía y por tanto tendremos una magnetización macroscópica neta orientada paralela al campo magnético, que será proporcional al número de protones contenidos en el volumen del animal.

Para poder medir la magnetización macroscópica resultante es necesario aplicar un pulso de radiofrecuencia, de manera que la magnetización gire a un plano transversal (pulso de excitación).

Otoño 2019. Número 83

Cuando este pulso cesa, la magnetización oscilante inducirá una corriente en una bobina receptora y habremos detectado la señal de RMN.

Las diferencias químicas en los entornos moleculares de esos protones, así como la abundancia de estos y la gran variedad de pulsos de excitación; hacen posible que detectemos información anatómica, funcional y molecular de los órganos y tejidos del animal. Esto nos permite diferenciar entre tejidos que en otros sistemas de imagen presentan poco contraste, como son los tejidos blandos y de ahí su importancia en el estudio del SNC<sup>6</sup>.

Para la obtención de las imágenes presentadas en este artículo se ha utilizado el equipo de Imagen y Espectroscopía de Resonancia Magnética de alto campo *in vivo* TM 70/20 USR (7 Teslas) con una Criosonda de IRM de Bruker Biospec pertenecientes a la Universidad de Granada.

El uso de la criosonda hace que aumente la relación señal/ruido del campo magnético del equipo y, por tanto, permite ver estructuras más pequeñas con mayor sensibilidad. Aquí se muestra el cerebro de un ratón con una resolución de 78 x 78 μm en el plano.

Los ratones se mantienen anestesiados durante toda la exploración (isoflorano ~1,5% en aire), y la frecuencia respiratoria, así como la temperatura corporal, son monitorizadas en tiempo real.

#### **SECCIONES CEREBRALES**

Siguiendo las secciones a los diferentes niveles mencionadas previamente, realizaremos una descripción básica destacando las funciones asociadas a dichas áreas y su significación en determinados procesos vitales.

#### Nivel 1

El nivel 1 (ver Figura 2) está tomado 1-2 mm por delante del quiasma óptico e incluye varias áreas corticales (córtex frontoparietal, córtex cingulado y córtex piriforme) y ganglios basales como el núcleo caudado-putamen (cuerpo estriado), el núcleo septal, el accumbens, la comisura anterior y el cuerpo calloso.

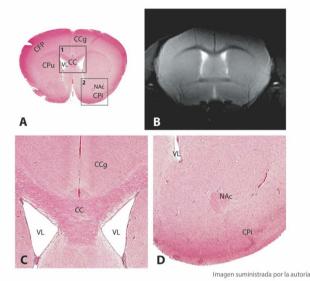


Figura 2.- Principales estructuras anatómicas del nivel 1 del cerebro murino adulto. A. Mosaico obtenido por yuxtaposición de varias imágenes microscópicas con objetivo de 4x. Se muestran las siglas de las principales estructuras anatómicas visibles en la sección histológica (vid infra). B. Imagen equivalente obtenida por resonancia magnética nuclear en un ratón anestesiado. C. Detalle del recuadro 1 en A (4x). D. Detalle del recuadro 2 en A (4x). Siglas utilizadas: CFP, córtex fronto-parietal; CCg, córtex cingulado; CC, cuerpo calloso; VL, ventrículos laterales; CPu, núcleo caudado-putamen; NAc, núcleo accumbens; y CPi, córtex piriforme.

La corteza cerebral o córtex está formada por el conjunto de células que recubren la superficie del cerebro. La parte frontoparietal participa en las funciones motoras (córtex frontal) y somatosensoriales (córtex parietal), recibiendo las señales de los receptores mecánicos y de la propiocepción cutánea y de las vibrisas. El córtex cingulado se relaciona con el aprendizaje espacial y el retraso en la respuesta, mientras que el córtex piriforme representa el área olfativa del cerebro.

Otra parte importante a este nivel es el núcleo caudadoputamen que, en conjunto, se denomina cuerpo estriado. Recibe las fibras nerviosas desde la corteza y también desde la sustancia nigra. Regula el movimiento, con lo que se ve afectado en enfermedades como el Parkinson y la enfermedad de Huntington<sup>7</sup>. El núcleo accumbens, que se encuentra en posición ventral al cuerpo estriado, juega un papel importante en las adicciones y en la sensación de miedo.

Los dos hemisferios cerebrales están unidos por el cuerpo calloso, la comisura hipocampal y la comisura anterior. El cuerpo

# Tinciones y tejido

calloso, formado por los axones neuronales, integra la actividad neuronal entre los dos hemisferios cerebrales. Su lesión parece estar asociada a desordenes psiquiátricos como el síndrome bipolar, las migrañas y la depresión en humanos<sup>8</sup>.

#### Nivel 2

En el nivel 2 (ver Figura 3) nos encontramos la continuación de la corteza cerebral del nivel 1 y, además, estructuras como el hipocampo, el tálamo, el hipotálamo y la amígdala.

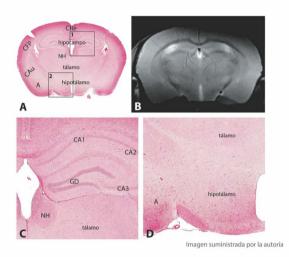


Figura 3.- Principales estructuras anatómicas del nivel 2 del cerebro murino adulto. A. Mosaico obtenido por yuxtaposición de varias imágenes microscópicas con objetivo de 4x. Se muestran las siglas de las principales estructuras anatómicas visibles en la sección histológica (vid infra). B. Imagen equivalente obtenida por resonancia magnética nuclear en un ratón anestesiado. C. Detalle del recuadro 1 en A (4x). D. Detalle del recuadro 2 en A (4x). Siglas utilizadas: CFP, córtex fronto-parietal; CRe, córtex retroesplénico; CAu, córtex auditivo; CA, cuernos de Amón del hipocampo (regiones CA1, CA2 y CA3); GD, giro dentado del hipocampo; NH, núcleo habenular; y A, amígdala.

En el hipocampo tienen lugar los procesos de aprendizaje y memoria, relacionándose también con el origen de la epilepsia y con los primeros cambios histopatológicos del Alzheimer. Anatómicamente, se compone de los cuernos de Amón (subdivididos en tres regiones CA1, CA2 y CA3) y el giro dentado, siendo este último uno de los pocos sitios del cerebro donde parece ser que puede existir neurogénesis en adultos<sup>9</sup>.

El tálamo constituye la puerta de entrada del sentido del tacto y la propiocepción desde la médula hasta la corteza parietal. También está conectado con el cerebelo para controlar la función motora.

El núcleo habenular parece una estructura bien conservada en todos los mamíferos. Está localizado dorsalmente al tálamo y se encarga de procesar la sensación de dolor, comportamiento reproductivo, nutricional, ciclos de sueño-vigilia, respuesta al estrés y actividades de aprendizaje<sup>10</sup>.

El hipotálamo (ventral al tálamo) está implicado en mecanismos de homeostasis como: la función cardiovascular, los ritmos hormonales y circadianos, comida, bebida, sueño o termorregulación.

Finalmente, la amígdala está conectada con muchas otras áreas cerebrales y juega un papel importante en el miedo, la ansiedad y la depresión<sup>11</sup>.

#### Nivel 3

En el nivel 3 (ver Figura 4), la región cortical incluye la parte más dorsal hasta la ventral, la corteza visual (occipital), la corteza auditiva (temporal) y la corteza entorrinal. En la parte central, desde la parte más dorsal a la más ventral, encontramos los colículos superiores, los núcleos geniculados, el núcleo rafe y la sustancia nigra.

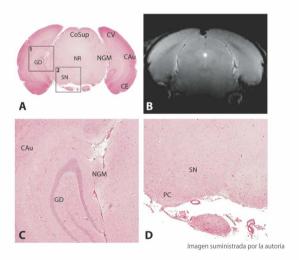


Figura 4.- Principales estructuras anatómicas del nivel 3 del cerebro murino adulto. A. Mosaico obtenido por yuxtaposición de varias imágenes microscópicas con objetivo de 4x. Se muestran las siglas de las principales estructuras anatómicas visibles en la sección histológica (vid infra). B. Imagen equivalente obtenida por resonancia magnética nuclear en un ratón anestesiado. C. Detalle del recuadro 1 en A (4x). D. Detalle del recuadro 2 en A (4x). Siglas utilizadas: CV, córtex visual; CAu, córtex auditivo; CE, córtex entorrinal; CoSup; colículos superiores; NGM, núcleo geniculado medial; GD, Giro dentado; NR, núcleo rafe; SN, sustancia nigra; y PC, pedúnculos cerebrales.

El colículo superior juega un papel importante en la atención visual y en el control del movimiento de los ojos (más importante en otras especies como peces y pájaros); mientras que el núcleo geniculado lateral se encarga de recibir la información visual desde las células ganglionares de la retina y transmitirla a la corteza visual. El núcleo geniculado medial transmite la información auditiva desde el colículo inferior a la corteza auditiva. Forma parte del mantenimiento de la atención.

El núcleo rafe es el centro serotoninérgico del cerebro a partir del cual la serotonina llega a la parte anterior del cerebro. Está formado por un conjunto de núcleos que se proyectan craneal y caudalmente. Dado el papel de la serotonina en el apetito, ciclos de vigilia/sueño o ansiedad, se ha convertido en un centro diana de muchos fármacos de ensayo en humanos<sup>12</sup>.

La sustancia nigra que, pese a su nombre, no contiene neuromelanina en roedores ocupa la parte más ventral de este nivel. Está formada principalmente por neuronas dopaminérgicas, que son las alteradas en enfermedades neurodegenerativas (Parkinson y Huntington), al igual que forma parte de los comportamientos adictivos. Ventralmente a la sustancia nigra están los pedúnculos cerebrales que transmiten la información motora desde el tálamo al cerebelo y la médula.

#### Nivel 4

En el nivel 4 (ver Figura 5) encontramos dorsalmente el cerebelo, anatómicamente compuesto por diferentes lóbulos (vermis, lóbulos ansiformes y parafloculares entre otros). Histológicamente, cada uno de sus lóbulos está formado por 3 capas celulares: la capa molecular (con poca densidad celular), la capa de células de Purkinje (con su gran soma triangular y árbol dendrítico dirigido hacia la capa molecular) y la capa granular (de neuronas pequeñas) que es la más profunda (ver inserto en Figura 5C). La principal función del cerebelo es la motora y su lesión produce síntomas en este sentido; pero también, cambios en su estructura se han asociado en humanos a desórdenes de atención e hiperactividad<sup>13</sup> y, en ratas, a comportamientos de hiperactividad<sup>14</sup>.

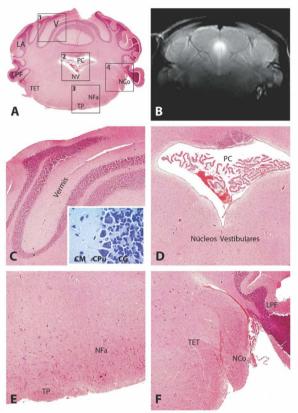


Imagen suministrada por la autoría

Figura 5.- Principales estructuras anatómicas del nivel 4 del cerebro murino adulto. A. Mosaico obtenido por yuxtaposición de varias imágenes microscópicas con objetivo de 4x. Se muestran las siglas de las principales estructuras anatómicas visibles en la sección histológica (vid infra). B. Imagen equivalente obtenida por resonancia magnética nuclear en un ratón anestesiado. C-F. Detalles de los recuadros 1-4, respectivamente, en A (4x). Inserto en C, detalle de las capas celulares del cerebelo (40x) en una sección teñida con azul de toluidina. Siglas utilizadas: V, vermis del cerebelo; LA, lóbulo ansiforme del cerebelo; LPF, lóbulo paraflocular; CM, capa molecular; CPu, capa de células de Purkinje; CG, capa granular; NV, núcleos vestibulares; PC, plexos coroideos; NCo, núcleo coclear; TET, tracto espinal del nervio trigémino; NFa, núcleo facial; yTP, tractos piramidales.

Debajo del cerebelo se encuentra el complejo vestibular formado por varios núcleos y cuya principal función es el mantenimiento del equilibrio. Los núcleos cocleares localizados dorsolateralmente a la médula oblongata son el primer punto de entrada del nervio auditivo en el sistema nervioso. A su vez, el núcleo facial está compuesto por nervios motores que controlan los músculos superficiales de la cabeza y cuello. Por último, el tracto espinal del nervio trigémino conduce las terminaciones aferentes de la región oftálmica, mandibular y maxilar.

# Tinciones y tejido

#### **CONCLUSIONES**

El uso de diferentes técnicas de imagen para el reconocimiento de lesiones neurológicas es cada día más necesario. La imagen por resonancia magnética nos permite hacer un seguimiento de la enfermedad y de la eficacia de los tratamientos sin necesidad de sacrificar a los animales; pero es imprescindible tener un conocimiento de la anatomía y la histología de los modelos usados, para poder luego asociar un cambio en la imagen de resonancia con dicha lesión. Este artículo quiere aportar su granito de arena al reconocimiento de diferentes estructuras en el SNC comparando la imagen de RMN con la histología.

#### **BIBLIOGRAFÍA**

- Snyder J.M. and col. Nervous System. Comparative Anatomy and Histology: A mouse and human atlas. Elsevier. Capítulo 20, pag. 403-44. 2018
- 2. Bolon B., Garman R.H., Pardo I.D., et al. STP Position paper: Recommended practices for sampling and processing the nervous system (brain, spinal cord, nerve and eye) during nonclinical general toxicology studies. Toxicol. Pathol. 2013;41:1028-48.
- 3. Fix D.S. and Garman R.H. *Practical aspects of neuropathology: A technical guide for working with nervous system*. Toxicol. Pathol. 2000;28:122-31.
- 4. Rao D.B., Little P.B., and Sills R.C. Subsite awareness in neuropathology evaluation of national toxicology program (NTP) studies: A review of select neuroanatomical structures with their functional significance in rodents. Toxicol. Pathol. 2014;42(3):487-509.
- 5. Morawietz G., Ruehl-Fehlert C., Kittel B., et al. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice Part 3. Exp. Toxicol. Pathol. 2004;55(6):433-49.
- 6. Brown M.A. and Semelka R.C. *MRI: Basic Principles and Apliccations.* In: Wiley-Liss, New Jersey. 2003.
- 7. Skaper S.D. and Giusti P. *Transgenic mouse models of Parkinson's disease and Huntington's disease*. CNS Neurol. Disord. Drug Targets. 2010;9(4):455-70.
- 8. Yu D., Yuan K., Zhao L., et al. White matter integrity affected by depressive symptoms in migraine without aura: A tract-based spatial statistics study. NMR in Biomedicine. 2013;26:1103-12.
- Cosgrave A.S., McKay J.S., Morris R., et al. The effects of nitric oxide inhibition prior to kainic acid treatment on neuro- and gliogenesis in the rat dentate gyrus in vivo and in vitro. Histol. Histopathol. 2010;25:841-56.

- 10. Andres K.H., von Düring M., and Veh R.W. *Subnuclear organization of the rat habenular complexes*. J. Comp. Neurol. 1999;407(1):130-50.
- 11. Rosen J.B. and Donley M.P. Animal studies of amygdala function in fear and uncertainty: Relevance to human research. Biol. Psychol. 2006;73(1):49-60.
- 12. Garattini S., Bizzi A., Caccia S., et al. Progress in assessing the role of serotonin in the control of food intake. Clin. Neuropharmacol. 1988;11(S1):S8-32.
- 13.O'Halloran C.J., Kinsella G.J., Storey E., et al. The cerebellum and neuropsychological functioning: A critical review. J. Clin. Exp. Neuropsychol.2011;34(1):35-56.
- 14. Altman J. Morphological and behavioral markers of environmentally induced retardation of brain development: An animal model. Environ. Health Perspect. 1987;74:153-68.



# ABSLab Lab ABSLab ABSLab ABSLab

## Plan Nacional de Biocustodia



Oscar González López

Biólogo, Técnico área NCB-3 Servicios Nucleus, Universidad de Salamanca

Siempre que trabajamos con agentes biológicos tenemos (o deberíamos tener) en cuenta el concepto de bioseguridad; sin embargo, hay otro término muy relacionado que muchas veces se desconoce o no se le da tanta importancia: la biocustodia (o bioprotección). *Grosso modo*, mientras que la bioseguridad trata de proteger a las personas de los agentes biológicos, la biocustodia protege a los agentes biológicos de las personas, es decir, previene su uso malintencionado.

Desde la aparición del ser humano (y muchos homínidos anteriores) se lleva desarrollando la tecnología armamentística y las enfermedades han sido parte de esta batalla desde hace milenios como muestran grabados y escritos de civilizaciones antiguas usando los cadáveres de enfermos para luchar contra sus enemigos mucho antes de conocer la etiología de dichas enfermedades. Como con el resto de las tecnologías armamentísticas, las armas biológicas han sido investigadas y optimizadas hasta haber sido utilizadas como armas de destrucción masiva en numerosas guerras. Sin embargo, debido a su peligrosidad, capacidad de dispersión (más de una vez han causado casi las mismas bajas a quien las utilizan que al enemigo) y la falta de especificidad siendo en muchos casos usadas sobre la población civil, en 1972 se prohibió internacionalmente su uso mediante la Convención sobre la Prohibición del Desarrollo, la Producción y el Almacenamiento de Armas Biológicas y Toxínicas; lo que, en principio, debería limitar su uso a ataques terroristas.

Además de los patógenos o toxinas que pueden ser usados como armas, existen agentes biológicos que pueden ser usados para sabotaje industrial, destrucción de cultivos e incluso contra la economía de un país. Todos recordamos el gran bloqueo a la exportación de productos porcinos que hubo en España durante casi tres décadas, tras la entrada de la Peste Porcina Africana en 1958; imagínense lo que podría provocar el robo de un solo vial de este virus del Centro Europeo de Referencia para el estudio de la

Peste Porcina Africana, situado a menos de 50 km del centro de Madrid (CISA-INIA), y su dispersión malintencionada entre la cabaña ganadera.

La biocustodia también consta de otro aspecto quizás menos visible pero igual de peligroso, que es el control del acceso a la información. En 2013, tras una censura inicial y contra la opinión de una parte de la comunidad científica, se publicaron en detalle en la revista *Science* las 5 mutaciones que conferían al virus de la gripe H5N1 (extremadamente mortal en aves) la capacidad de transmitirse entre mamíferos, lo que generó un gran revuelo debido a la facilidad y el bajo coste que supondría realizar esas 5 mutaciones usando las herramientas genéticas actuales. Y es que la información en sí puede ser muy peligrosa si cae en manos de la persona equivocada; en muchos centros, ésta se encuentra en un ordenador controlado por un Windows XP desactualizado y sin más protección que la versión gratuita de *Avast*.

En 2001, una semana después de los atentados de las Torres Gemelas, se produjo otro ataque terrorista en EE. UU. mediante el envío de cartas que contenían esporas de *Bacillus anthracis* (Carbunco/Ántrax) que, como después se supo, pertenecían a una cepa sustraída del laboratorio de máximo Nivel de Contención Biológica (NCB4) Fort Detrick. Este hecho hizo que las políticas de vigilancia y control de patógenos (biocustodia) empezaran a ser tenidas en cuenta de manera más seria, en especial en los laboratorios de alto nivel de contención. Algunos países, preocupados por lo ocurrido, desarrollaron de inmediato leyes que obligaban a los centros, que manejasen agentes biológicos, a llevar a cabo medidas que aseguraran la biocustodia de los mismos.

En España (como vamos un poco a nuestro ritmo y derivado de la Estrategia de Seguridad Nacional de 2013), se ha aprobado en enero de este año el primer Plan Nacional de Biocustodia que, debido a diversas causas, seguramente tardará en adoptarse e imponerse.

# ABSLab Lab ABS Lab ABS Lab

¿Debemos entonces preocuparnos por la presencia de patógenos sin una Ley de Biocustodia adecuada? No, desde hace años la legislación española sobre bioseguridad ha quedado escasa y obsoleta (el RD 664/97 ha cumplido ya 22 añitos); sin embargo, las instalaciones en las que se manejan agentes biológicos peligrosos cuentan con profesionales de Bioseguridad que van más allá de la legislación española e implantan, a título particular, las medidas de bioseguridad y biocustodia internacionalmente aceptadas.

El Plan Nacional de Biocustodia pretende asegurar que las instalaciones en las que se trabaja con agentes biológicos relevantes, cuenten con unas medidas de control de stocks que se adecuen al nivel de peligrosidad de dichos agentes biológicos; y para ello, se creará una Comisión Nacional de Biocustodia que será el Organismo Interministerial que lleve a cabo: el seguimiento y control de la adopción del Plan desarrollando la normativa accesoria necesaria, la supervisión del cumplimiento de dicha normativa en las instalaciones, y la verificación de las actividades llevadas a cabo en las mismas con los agentes biológicos.

Para ello, el primer objetivo es crear un inventario a escala nacional. El RD 664/97 hasta ahora obligaba a notificar la utilización por primera vez de agentes biológicos de grupo de riesgo 2, 3 o 4 a la autoridad laboral de cada Comunidad Autónoma, detallando las medidas de bioseguridad adoptadas para trabajar de manera segura con dicho agente; sin embargo, en muchas comunidades la autoridad laboral no está ligada a los servicios de Prevención de Riesgos Laborales y por lo tanto no se lleva a cabo un seguimiento ni una evaluación exhaustiva de estas medidas. La Comisión Nacional de Biocustodia recopilará informes de cualquier agente biológico peligroso para el ser humano, animales o vegetales; detallando su peligrosidad, almacenamiento, cantidad, uso (investigación, diagnóstico...) y las medidas de custodia que se adecuen al nivel de peligrosidad de cada agente biológico, proporcionando o denegando la habilitación de seguridad necesaria para trabajar con estos agentes, y supervisando siempre el cumplimiento de dichas medidas. Como organismo del Sistema de Seguridad Nacional, analizará la información recabada de la Red de Laboratorios de Alerta Biológica (RE-LAB) y colaborará con las Fuerzas y Cuerpos de Seguridad en la creación de planes de protección física de las instalaciones contra sabotajes, ataques terroristas y en el desarrollo de planes de actuación ante emergencias biológicas. Así mismo, se controlará el acceso restringido del personal a los agentes biológicos relevantes (ya lo exigía el RD 664/97 para los del grupo de riesgo 3 y 4) y supervisará

los sistemas de control para prevenir sustracciones o uso indebido del material biológico presente en las instalaciones.

Otro de los puntos donde actuará la Comisión Nacional de Biocustodia será en el transporte de agentes biológicos, haciendo obligatorio declarar dicho transporte cumpliendo con las normativas de transporte de mercancías peligrosas (ADR o IATA), detallando las entidades emisoras y receptoras de éste. También desarrollará una normativa específica para la custodia de muestras durante su transporte; en ella, los transportistas deberán poseer una habilitación de seguridad que otorguen las Fuerzas y Cuerpos de Seguridad, los cuáles controlarán los itinerarios y planes de contingencia y emergencia que formarán parte del protocolo de transporte.

Como antes mencionamos, la biocustodia también contempla la protección de aspectos intangibles como es la información acerca de los agentes biológicos. Por ello, se exigirá a todas las instalaciones declaradas informes periódicos sobre los resultados parciales de las investigaciones, con el fin de detectar un potencial "doble uso", experimentos de "ganancia de función" o cualquier otra actividad peligrosa, y se establecerán códigos de conducta y confidencialidad para el personal con acceso a agentes biológicos relevantes.

Por último, y aunque no lo parezca, una de las funciones más importantes que tendrá la Comisión Nacional de Biocustodia será desarrollar actividades de concienciación, educación, movilización y formación de los actores implicados en la biocustodia. Para llevar a cabo esta tarea, estoy seguro de que muchos profesionales de la Asociación Española de Bioseguridad (AEBioS) estarán encantados de aportar su experiencia, ya que la misión principal de nuestra asociación es difundir los conocimientos sobre la bioseguridad.

Con la aplicación del Plan Nacional de Biocustodia, parece que por fin daremos un gran paso hacia la regulación de la tenencia de agentes biológicos y se dificultará su uso con fines de terrorismo o sabotaje, cumpliendo así lo firmado en la Convención sobre la Prohibición del Desarrollo, la Producción y el Almacenamiento de Armas Biológicas y Toxínicas. El gran punto a favor de la correcta aplicación del plan es la creación y dotación con suficientes medios a un organismo de expertos que sea responsable del seguimiento a nivel nacional. Sin embargo, hasta que no se empiece a aplicar no sabremos lo estricta que será la normativa que se desarrolle y si harán un férreo seguimiento de las actividades llevadas a cabo en nuestras instalaciones.

# ABSLab O A B S La O A B S La O

#### **BIBLIOGRAFÍA**

- Orden PCI/168/2019, de 22 de febrero, por la que se publica el Plan Nacional de Biocustodia, aprobado por el Consejo de Seguridad Nacional.
- Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo.



Otoño 2019. Número 83

# Pruebas para el vaciado gástrico en cerdos

#### Sara Puy, Alba Boldó y Dolores C. García Olmo

Centre de Recerca Experimental Biomèdica Aplicada (CREBA), IRBLleida

#### INDICIO

El azúcar granulado (azúcar de mesa) puede ser útil para el vaciado gástrico necesario en procedimientos de endoscopia digestiva en cerdos.

#### INTRODUCCIÓN

Los procedimientos de endoscopia digestiva son frecuentes en el modelo porcino, tanto para proyectos de investigación, como para el adiestramiento de médicos digestólogos. Estas prácticas formativas son frecuentes, ya que acortan notablemente la curva de aprendizaje de los profesionales, lo que repercute directamente en la calidad de la asistencia sanitaria.

Para el personal técnico y veterinario, la mayor dificultad en la preparación de los cerdos para maniobras de endoscopia digestiva es lograr un vaciado gástrico completo, tanto por la morfología interna del estómago (repliegues de la mucosa, ver Figura 1), como por la variabilidad individual de la propia especie e incluso por determinadas patologías que pueden ser subclínicas (por ejemplo, *Lawsonia intracellularis*).



Figura 1.- Imágenes endoscópicas del estómago de cerdos tras 12 horas de ayuno. A. Repliegues de la mucosa gástrica. B y C. Estómagos con vaciado gástrico óptimo. D y E. Estómagos con mal vaciado gástrico. F. Estómago de un animal afectado por Lawsonia intracellularis, en el que el vaciado gástrico fue imposible.

#### **OBJETIVO DE LA PRUEBA**

Encontrar un método que contribuya al vaciado gástrico, sin tener que aumentar el tiempo de ayuno (12 horas).

#### **ANIMALES Y MÉTODOS**

Se incluyeron 38 cerdas, híbridos comerciales, con un rango de peso de 26-47 kg, que se utilizaron para actividades docentes de endoscopia médica. En el momento de la endoscopia no habían sido sometidos a intervenciones previas.

#### Manejo dietético

El manejo dietético fue igual para todos los animales. Habitualmente, suministramos pienso granulado comercial para cerdos (Cerdas gestantes, Agrovilanova S.L., Vilanova de la Barca, Lérida) en una cantidad equivalente al 3% del peso vivo de los animales. Dos días antes del procedimiento se les disminuyó a un 2% y por último se realizó un ayuno de 12 horas, que coincidía con las horas de oscuridad. Se eliminó la fruta (manzanas y peras) de la dieta, y se eliminaron también los elementos de enriquecimiento que pudieran mordisquear y accidentalmente ingerir.

A 16 animales se aplicó sólo esta pauta dietética, sin otros tratamientos posteriores. A otros 2 se les ofreció un puñado de azúcar (equivalente a 100 g aproximadamente) en la zona de estabulación, antes de la premedicación anestésica (ver Figura 2). En general, lo ingirieron rápidamente.

Tras administrar los anestésicos para la sedación, y una vez perdido el reflejo de estación se trasladaron al prequirófano, donde se preoxigenaron y lavaron. Una vez en el quirófano se valoró el contenido gástrico, en primer lugar, mediante sondaje esofágico y, seguidamente, con gastroscopia.

### **Indicios**



Imagen suministrada por la autoría

Figura 2.- Imágenes de cerdos comiendo azúcar.

#### Manejo farmacológico

Se probaron diversos tratamientos, todos ellos sugeridos por facultativos de Medicina Humana, ya que se utilizan en pacientes:

- <u>Metoclopramida (n=14):</u> administramos 0,4 mg/kg por vía intramuscular. En 12 animales se hizo antes de la premedicación anestésica, y en 2 inmediatamente después.
- <u>Eritromicina (n=1):</u> administramos 3 mg/kg por vía intravenosa, 20-30 minutos antes de la intervención.
- Polietilenglicol (macrogol, n=5): administramos Moviprep® (Norgine Ltd., Mid Glamorgan, Reino Unido), la tarde anterior, por vía oral mezclado con un litro de agua, siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **RESULTADOS Y COMENTARIOS**

En los animales en que sólo se realizaba ayuno, la respuesta fue heterogénea: algunas veces daban buenos resultados y otras era imposible realizar un buen vaciado gástrico, lo que pudo ser debido a la variabilidad individual, aunque también a patologías subclínicas. De los 16 animales evaluados, 12 (75%) tuvieron un vaciado óptimo (ver Figura 1). En los 4 en los que no se consiguió, los procedimientos no pudieron realizarse de la forma deseada.

La administración de metoclopramida pareció asociarse con complicaciones cardiorrespiratorias cuando se administraba después de la sedación preanestésica (que incluía benzodiacepinas, ketamina, agonistas alfa-2 y atropina), posiblemente debido a que la metoclopramida es un antagonista mutuo con anticolinérgicos y derivados de la morfina. Así, cuando los trasladábamos a quirófano se produjeron bradicardias e hipocapnias, que pensamos que pudieron estar motivadas por esas interacciones. Los animales se tuvieron que tratar mediante maniobras de reanimación cardiopulmonar.

Cuando la metoclopramida se administró previamente a la sedación, no aparecieron estas complicaciones. De los 14 animales realizados sólo hubo dos en los que hubo mal vaciado, en los otros 12 (86%) los resultados fueron satisfactorios (ver Figura 1).

La eritromicina se administró 20-30 minutos antes del procedimiento. Al cabo de pocos minutos de la administración salió contenido por la sonda esofágica, pero no podemos asegurar que no fuera efecto del fármaco, sino casualidad, ya que sólo hicimos un animal. Abandonamos esta línea para evitar el uso innecesario de antibióticos.

El polietilenglicol (macrogol) no pudo administrarse de la forma indicada, ya que el comportamiento nervioso y atolondrado de los cerdos, impidió la ingesta de las cantidades indicadas, y en la mayoría de las ocasiones gran parte del producto terminó desperdiciándose. Así, en condiciones de estabulación y manejo habituales (sin protocolos especiales), no pudo registrarse la cantidad ingerida por cada individuo. No obstante, de los cinco animales tratados, en 4 (80%) se obtuvo el resultado esperado, y sólo uno dio problemas en el vaciado gástrico mostrando presencia de contenido imposible de aspirar.

Durante toda esta parte del estudio, se detectó *Lawsonia intracellularis* en algunos de los animales de la colonia, por lo que parte de los casos con vaciado deficiente pudieron estar asociados a este patógeno (ver Figura 1).

El consumo de azúcar dio un resultado óptimo en los dos animales en los que se probó, encontrando la mucosa gástrica completamente limpia en la mayor parte de la superficie, aún con los pliegues gástricos. Este método se aplicó después a otros 26 animales sometidos a eco-endoscopia en un modelo de dilatación biliar, y el contenido gástrico también fue óptimo para la maniobra endoscópica. Sin embargo, puesto que estos animales partían de un estado patológico, no podemos asegurar que el resultado conseguido fuera únicamente por el azúcar.

En definitiva, hemos adoptado la ingesta de azúcar de mesa en nuestros protocolos de preparación de cerdos para endoscopia gástrica, ya que además de parecer eficaz en el vaciado gástrico, tiene grandes ventajas: es de bajo coste y accesible en comercios convencionales, produce un aporte de glucosa que favorece el mantenimiento anestésico tras un ayuno, y no interacciona con otros fármacos administrados durante el protocolo anestésico. No obstante, se debe tener en cuenta que puede interferir en estudios metabólicos, o en los que se determinen los niveles de glucosa en sangre, por la hiperglucemia puntual que produce.

Creemos que lo ideal sería que esta ingesta tuviera lugar 20-30 minutos antes de la intervención, aunque en nuestro caso no siempre hubo esa antelación.

### Indicios

Este espacio está dedicado a recoger el conocimiento que adquirimos por la experiencia de nuestro trabajo diario, o las ideas que "nos funcionan", pero no tenemos tiempo, ni recursos, para poder demostrar o sustentar mediante el método científico.

#### **FORMATO**

Máximo de 1.000 palabras y dos imágenes, con dos apartados básicos:

- Planteamiento: exposición concisa de la idea.
- <u>Indicios</u>: datos e indicios que han motivado esta idea.

Podéis enviar las propuestas a Lola García Olmo dgarcia@creballeida.org.



dirección.revista@secal.es



## Entrevista



# Manuel Miguel Jordán Vidal

**Vicerrector de Investigación e Innovación** *Universidad Miguel Hernández* 

Redactor: Hernán Serna Duque



#### Breve descripción profesional

Licenciado en Ciencias Químicas por la Universidad de Valencia y Doctor en Ciencias Químicas por la Universitat Jaume I de Castellón. He participado en cargos de Gestión Universitaria tales como Secretario de Facultad, Secretario de la Comisión de Doctorado, Vicerrector adjunto, Vicerrector de Relaciones Internacionales v. en la actualidad. Vicerrector de Investigación e Innovación, formando parte del Consejo de Gobierno de la Universidad Miguel Hernández (UMH). Actualmente, presido la Comisión de Directrices de la Rama de Ciencias, la Comisión de Investigación y el Órgano Evaluador de Proyectos de la UMH (habilitado para la evaluación de proyectos en animales de experimentación por la autoridad competente de la CCVV). También he ocupado cargos de gestión en la Sociedad Española de Arcillas (SEA) y soy evaluador de la ANEP (Agencia Nacional de Evaluación y Prospectiva) en el área de Ciencias de la Tierra y Medio Ambiente.

He realizado varias estancias de corta-media duración en centros nacionales e internacionales. Dichas estancias en centros de investigación han contribuido a mi formación personal y a fomentar relaciones de colaboración con grupos nacionales e internacionales. He publicado más de 180 artículos en revistas científicas. He participado como investigador principal o miembro del grupo de investigación en 67 proyectos: 34 proyectos de investigación y ayudas I+D (Unión Europea, Ministerios, Comunidad Autónoma, etc.) y 33 contratos de investigación con empresas y/o administraciones. Soy miembro de las siguientes sociedades científicas: Sociedad Española de Ciencias del Suelo, Real Sociedad Española de Química, Grupo Especializado en Cristalografía y Crecimiento Cristalino, Sociedad Española de Arcillas y Asociación Española de Científicos. También soy miembro del Working Group on Soil Research in the frame of the development of EU Soil Policy (European Commission).

# Antes de esta entrevista, ¿conocía la Sociedad Española para la Ciencia del Animal de Laboratorio (SECAL)?

Sí, por supuesto. SECAL es la sociedad más destacada en el ámbito del animal de laboratorio en España.

# ¿Cómo definiría la Universidad Miguel Hernández y qué aspectos destacaría de ella en investigación?

La Universidad Miguel Hernández de Elche es una universidad joven e intensamente investigadora, estando siempre situada entre las 10 Universidades españolas más productivas en investigación en los diferentes rankings. Estamos trabajando para lograr, en 2019, el sello de excelencia en recursos humanos en investigación, mejorando de forma significativa las condiciones de trabajo y empleo para los investigadores, y haciendo más atractiva la carrera investigadora en nuestra institución. Desde la vertiente del desarrollo sostenible y medio ambiente hemos implementado políticas que nos permiten ocupar una excelente posición en el GreenMetric, sin olvidar la implantación del programa UMH Saludable.

La Oficina de Investigación Responsable (OIR) nace como respuesta a la creciente normativa que regula el desarrollo de los procedimientos experimentales. El objetivo es doble, ofrecer garantías de que la actividad investigadora se realiza en un marco ético, seguro y legal adecuado, y mejorar la calidad de la ciencia realizada en la UMH. Todo ello colaborando de manera integral y permanente con los investigadores. La Oficina da soporte administrativo al Órgano Evaluador de Proyectos, que evalúa desde un punto de vista ético-legal los proyectos de investigación de la UMH en animales y humanos, sin olvidar las repercusiones sobre los riesgos laborales y medioambientales. Para la creación de la OIR se tomó como referencia el modelo anglosajón de *Research Compliance Office* presente en numerosas universidades americanas, entre las que destacan Harvard, Stanford y Boston.

Se están desarrollando muchos esfuerzos en comunicación y difusión de la investigación que estamos realizando en la UMH desde los últimos años. De hecho, la difusión de la ciencia es financiada por el vicerrectorado de investigación e innovación, pues contamos con un programa propio. Se ha modificado la Normativa de Evaluación de la Actividad Investigadora y Transferencia de conocimiento para reconocer todas las actividades de divulgación científica. Hemos creado la revista de divulgación UMH Sapiens y se han realizado videos promocionales de nuestros grupos de investigación y banco de patentes.

Además, somos una de las instituciones adheridas al Acuerdo de transparencia sobre el uso de animales en experimentación científica en España promovido por COSCE (Confederación deSociedades Científicas de España). La gestión de este acuerdo se lleva a cabo desde la OIR.

Si reserva parte de su tiempo a la investigación o la docencia, ¿qué investiga o imparte ahora mismo?

Mis líneas de investigación actuales no están relacionadas con animales y son las siguientes:

- Estudio mineralógico y físico químico del material particulado atmosférico.
- Incorporación de residuos de diferentes ámbitos en materiales de construcción.
- Estudio de fases de alta temperatura en materiales cerámicos y vítreos.
- Mineralogía de suelos afectados por grandes incendios forestales.
- Huella de carbono y gases de efecto invernadero. Hemos captado recientemente fondos procedentes de un proyecto LIFE en este ámbito.

# ¿Cree que el uso de modelos animales es imprescindible en investigación biomédica?

Los científicos tenemos claro que la investigación con animales es un paso fundamental en numerosos estudios. No obstante, siempre hay que garantizar la idoneidad del uso de animales para un determinado fin. Nos lo exige la normativa y, aunque no fuera así, estamos plenamente concienciados de la necesidad ética de optimizar el uso de animales mediante la aplicación de las 3 erres. Gracias a la investigación con animales, la esperanza de vida, prácticamente, se ha doblado en un siglo, desde unos 44 años en 1900 hasta los casi 83 actuales. Este aumento se debe a tres motivos principales: a los avances médicos producidos gracias a la investigación con animales, a las mejoras en la alimentación y a las mejoras en las condiciones higiénicas.

# ¿Qué líneas de investigación con biomodelos se desarrollan, actualmente, en la Universidad y qué proyectos nuevos se plantean?

Muy resumidamente, las líneas de investigación con animales en la UMH se centran en:

- Problemas metabólicos, como la diabetes.
- Enfermedades neurológicas, como el Alzheimer, el Parkinson o la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA).

### Entrevista

- Enfermedades oculares.
- Adicción a las drogas.
- Diferentes tipos de cáncer.
- Enfermedades infecciosas humanas y animales.
- Enfermedades hepáticas, como la cirrosis.

# A nivel de valoración ética, ¿qué estructuras hay en la Universidad para la valoración de los proyectos de investigación con animales?

En relación con la investigación con animales, la Universidad cuenta con dos OEBAS (Órganos Encargados del Bienestar Animal) y un OH (Órgano Habilitado). Este OH es la Oficina Evaluadora de Proyectos que, como ya hemos mencionado anteriormente, evalúa desde un punto de vista ético-legal los proyectos de investigación de la UMH en animales y humanos, así como los riesgos laborales y medioambientales asociados a dichos proyectos. En breve, además, comenzará a evaluar el cumplimiento en materia de protección de datos personales con la incorporación al comité de la Delegada de Protección de Datos de la UMH.

# ¿Qué importancia tiene para usted el papel de los animalarios en la investigación?

Al tener clara la necesidad de usar modelos animales para avanzar en el conocimiento biomédico y la necesidad ética de ser escrupulosos con las 3 erres", debemos ser coherentes y disponer de instalaciones que cumplan con todas las garantías para proporcionar el máximo bienestar a nuestros animales. En la UMH tenemos 3 animalarios con buenos recursos humanos y económicos para conseguir este objetivo.

# En cuanto a las infraestructuras del campus, ¿qué proyectos hay en relación con los animalarios en los próximos años?

Recientemente, se han licitado dos nuevos edificios en el campus de San Juan. El traslado a estos edificios de varios grupos de investigación permitirá la ampliación del Servicio de Experimentación Animal.

Finalmente, y agradeciendo enormemente su tiempo para el desarrollo de esta entrevista, ¿qué opinión le merecen iniciativas como la revista Animales de Laboratorio de la SECAL?

Me parece una iniciativa elogiable que deberían abordar otras sociedades. Una manera muy amena de estar al día del mundo del animal de laboratorio y todo lo que le engloba.





# Un modelo al lado de los humanos

## ÉL NOS ESTÁ AYUDANDO A COMBATIR LOS ABORTOS POR LISTERIOSIS

Listeria monocytogenes es un patógeno oportunista transmitido por alimentos que causan Listeriosis humana y una alta mortalidad, particularmente, en individuos inmunocomprometidos. Las mujeres embarazadas son más propensas a esta infección, que ocasiona abortos.

En este ratón CD1 se investigó, recientemente, la actividad antilisterial de *Lactobacillus brevis*, una cepa bacteriana probiótica, obteniéndose unos resultados muy esperanzadores en cuanto a tratamiento y profilaxis de esta grave infección.



www.secal.es



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

