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

ANIVALES Primavera 2020. Número 85 DE LABORATORIO





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

- + Global availability of high-quality research animal models
- + World-leading Teklad Global Diets® designed to minimize research variables
- Health and genetic testing, surgery, custom breeding and antibodies
- Transgenic models and services to advance disease research and drug development

Download our radiosensitivity of immunodeficient mice white paper at:

envigo.com/r2g2-cancer



GRUPO EDITOR

Grupo Editor





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

www.secal.es

DIRECTORA

Lara Sedó Cabezón

SUBDIRECTORA

Maria Granada Picazo Martinez direccion.revista@secal.es

EDITORES DE ESTILO E IMAGEN

Olga Fernández Rodríguez omfr75@yahoo.es Rubén Mota Blanco ramota@externo.cnic.es

PUBLICIDAD

publicidad.revista@secal.es

FOTO DE PORTADA

Suministrada por la SECAL DISEÑO Y MAQUETACIÓN

www.cervantes.agency pluscs@hotmail.com

IMPRIME

LPG

lpatextil@amail.coi

DEPÓSITO LEGAL

M-1362-1999

Contención y adaptación al medio

Esta editorial iba de otra cosa. El número 85, el que corresponde a la primavera, estaba planteado de otra manera, pero en menos de un mes hemos visto descompuesta esta idea junto con todo lo demás, hemos anulado todos nuestros proyectos profesionales y personales, llevándonos, en algunos casos, al más absoluto ostracismo. Estábamos acostumbrados a un presente eterno, pensábamos que seríamos capaces de controlar el entorno a nuestro antojo, puesto que el mundo estaba simplemente ahí, a nuestra disposición. Pero solamente con echar la vista atrás, nos damos cuenta de que vivir en las condiciones actuales ha sido gracias al progreso de las ciencias médicas que, junto a los descubrimientos de diferentes vacunas (viruela, cólera, etc.) y a la mejora en la nutrición e higiene, han hecho posible que hayamos llegado al mundo actual en estas circunstancias tan idóneas. Aunque esto no significa que no vuelvan a surgir nuevos desafíos y que haya que readaptarse a sus exigencias e innovar con respuestas desde el punto de vista científico, médico y social. En este punto nos encontramos y, aunque el ser humano tiene una capacidad adaptativa innata, el confinamiento también nos está permitiendo aprender y cultivar sentimientos que en muchas ocasiones teníamos aletargados como la paciencia, la generosidad, el sacrificio, el altruismo y la calma.

La SECAL, al completo, está demostrando estas cualidades, además de su responsabilidad y compromiso con la sociedad y la investigación de este país, por ello, queremos dedicar este número a todos y cada uno de vosotros: a los que cada mañana os levantáis para sustentar a los animales de sus necesidades esenciales; a los compañeros que habéis puesto a disposición de hospitales los equipos de respiración asistida, EPIs y hasta autoclaves; a los que, gracias a vuestros conocimientos, habéis aportado ideas, protocolos de trabajo y hasta ayuda técnica; y a todos los que estáis teletrabajando desde casa, intentando conciliar la vida profesional con la doméstica, manteniendo la templanza e intentando llegar a todo.

En esta revista encontraréis, como siempre, artículos de interés para todos los ámbitos de nuestro trabajo. Además, Lluís Montoliu nos ha preparado una interesante crónica que reflexiona acerca del papel de los animales de laboratorio ante el desafío del coronavirus.

Disfrutad de su lectura, como siempre o tal vez algo más.

Dirección de la revista

JUNTA DE GOBIERNO

PRESIDENCIA

Isabel Blanco Gutiérrez (2017-2021)

SECRETARÍA

Julia Samos Juárez (2017-2021)

TESORERÍA

Viviana Bisbal Velasco (2017-2021)

VOCALÍAS (2017-2021)

María Jesús Molina Cimadevila Elena Hevia Hernández David Mayo López John Sparrowe-Gil Del Real

VICEPRESIDENCIA

Juan Rodríguez Cuesta (2019-2023)

VICESECRETARÍA

Mónica Gómez-Juárez Sango (2019-2023)

VICETESORERÍA

Marta Miró Murillo (2019-2023)

VOCALÍAS (2019-2023)

Clara Sánchez González Oscar Pintado Sanjuán Carlos Carnero Guerrero Garikoitz Azkona Mendoza

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?/Un modelo al lado de los humanos JOSÉ LUIS MARTÍN BARRASA jlmbarrasa@gmail.com



Panorama JAVIER GUILLÉN IZCO jguillen@AAALAC.org



Control sanitario JOSEP Mª MARIMON ESCUDÉ jmmarimon@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

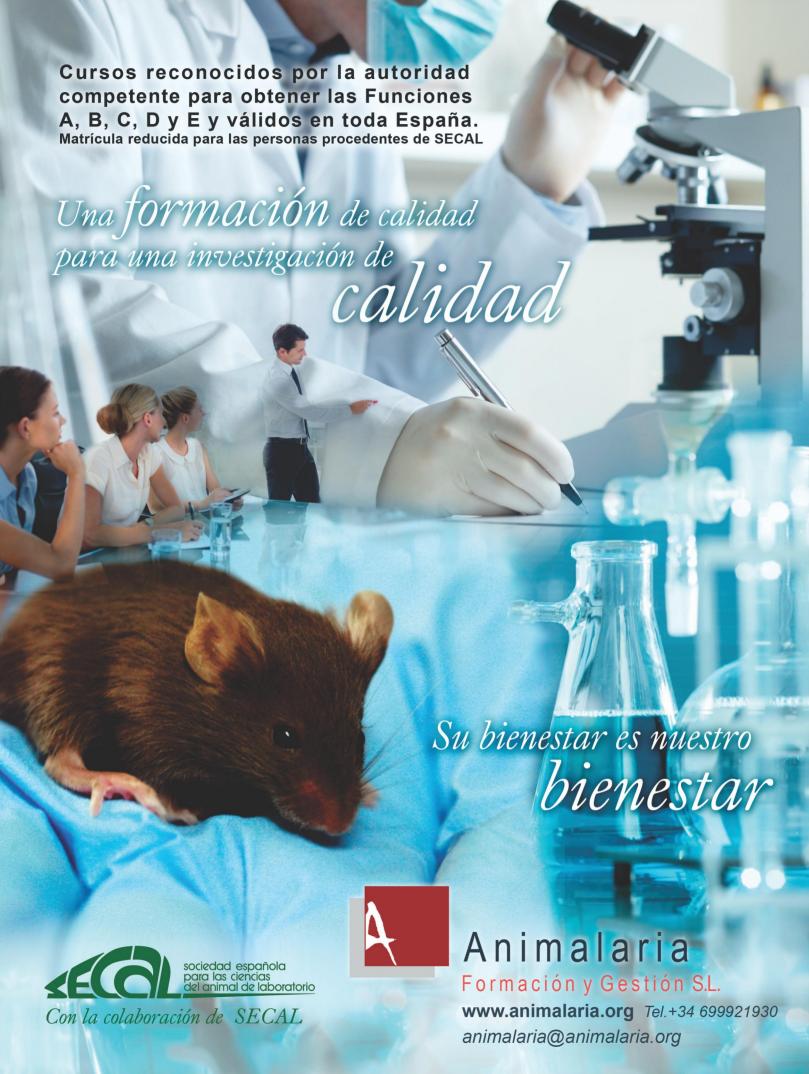


ABSLab
FRANCISCO JAVIER
GARCÍA PALOMO
jpalomo@usal.es



Indicios LOLA GARCÍA OLMO dgarcia@creballeida.org

Han colaborado en este número



ÍNDICE ÍNDICE ÍNDICEÍ

EDITORIAL

8 NOTICIAS

 La Comisión Europea publica su primer "Informe sobre las estadísticas relativas al uso de animales con fines científicos en los Estados miembros de la Unión Europea en 2015-2017".

14 ACTUALIDAD

- Los animales de laboratorio ante el desafío global del coronavirus.
- Asocian ultrasonidos a diferentes tipos de comportamiento social en ratones.

18 TÉCNICAS

- Estudios de tomografía axial computarizada abdominal en roedores mediante el uso de agentes de contraste.

22 SEGURIDAD EN 5 MINUTOS

- Pausas activas en el trabajo.

24 ALCUIDADO

Cultura del cuidado.

28 ¿YTÚ QUE OPINAS?

- Lo peligroso de... "hacer pie".

30 CONTROL SANITARIO

 Bases de la evaluación y seguimiento sanitario en instalaciones de pez cebra para investigación.

40 REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA

 Factores que pueden afectar al éxito en la criopreservación de embriones de ratón.

45 BIENESTAR ANIMAL

- Refinamiento de la técnica optogenética.

48 CEEA-OH

- Una cuestión de sexo y género.

53 ABSLab

 Vestuario de protección y protección respiratoria: recomendaciones de protección frente a agentes infecciosos.

61 UN MODELO AL LADO DE LOS HUMANOS

 Sus células nos enseñan la puerta de entrada del virus COVID-19.





Noticias SECAL

La Comisión Europea publica su primer "Informe sobre las estadísticas relativas al uso de animales con fines científicos en los Estados miembros de la Unión Europea en 2015-2017"

Palabras clave: estadísticas, experimentación, animales.

El 5 de febrero de 2020, la Comisión Europea publicó el primer informe sobre las estadísticas en aplicación de la Directiva 2010/63/UE (que sustituyó y derogó la Directiva 86/609/CEE) relativa a la protección de los animales utilizados con fines científicos en los Estados miembros de la Unión Europea (UE), acompañado de numerosos datos sobre el uso de animales en la ciencia en toda la UE.

La Directiva tiene como objetivo garantizar la igualdad de condiciones en la industria de la investigación de la UE, asegurar altos niveles de bienestar para los animales criados y utilizados con fines científicos, y mejorar la transparencia sobre el uso de animales con fines científicos en la UE. La Directiva introduce además el principio de las 3Rs: reemplazar, reducir y refinar el uso de animales para fines científicos.

La Directiva, que se empezó a aplicar en los países de la UE a partir de 2013, está considerada una de las más restrictivas para la experimentación con animales.

El informe analiza los datos en tres ámbitos distintos:

- Número de animales utilizados con fines de investigación, ensayo, producción rutinaria y educación (incluida la formación). Esos animales pueden ser tanto animales convencionales como alterados genéticamente.
- Detalles sobre todos los usos (primer uso y toda reutilización posterior) de animales con fines de investigación y ensayo. Tiene en cuenta la naturaleza de los procedimientos, su contexto legislativo, la reutilización de animales, su condición genética y el grado de severidad experimentado por el animal.
- Número y usos de animales para la creación y mantenimiento de líneas animales genéticamente alteradas.

NÚMERO TOTAL DE ANIMALES UTILIZADOS EN LA UE

Según el informe, en 2017 (último año con datos recopilados) se utilizaron 9,39 millones de animales para fines científicos por primera vez (en su primer uso). Mientras que en 2015 fueron 9,59 millones (ver Tabla 1). El informe reconoce que no muestra un claro descenso, pero concluye que, comparado con años anteriores, si que muestra una evolución positiva de acuerdo con los objetivos de la Directiva.

Tabla 1.- Número total de animales utilizados por primera vez con fines de investigación, ensayo, producción rutinaria y educación. Fuente: Informe Comisión Europea.

	2015	2016	2017
Total	9 590 379	9 817 946	9 388 162

Respecto a los usos, en 2017 se comunicaron 9,58 millones de usos animales para fines científicos, mientras que en 2015 fueron 9,78 (verTabla 2).

Tabla 2.- Número total de usos de animales en investigación y ensayo entre 2015 y 2017. Fuente: Informe Comisión Europea.

	2015	2016	2017
Total	9 782 570	10 028 498	9 581 741

El número de animales utilizados por primera vez para la creación y el mantenimiento de líneas animales genéticamente alteradas (GA) se situó en torno a los 1,2 millones (ver Tabla 3).

Tabla 3.- Número total de animales utilizados para la creación y mantenimiento de líneas animales genéticamente alteradas. Fuente: Informe Comisión Europea.

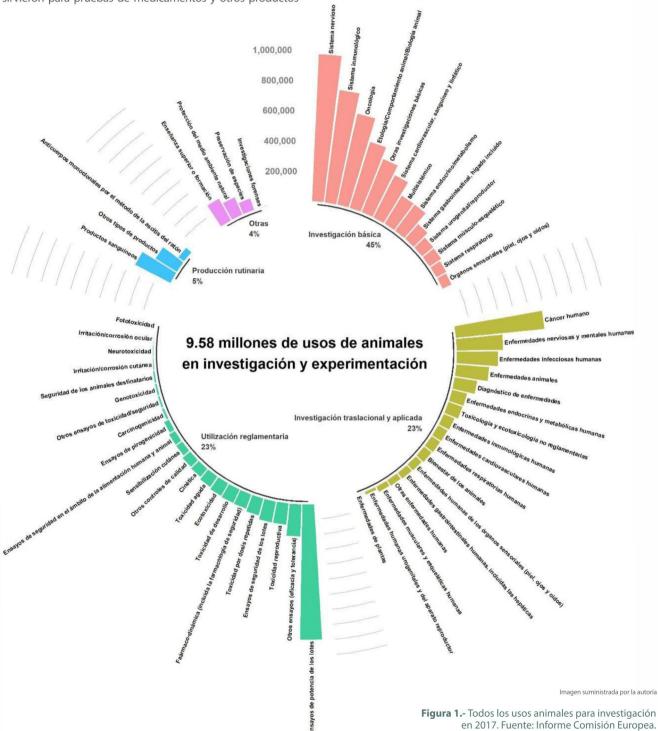
	2015	2016	2017
Creación GA	591 033	493 156	634 705
Mantenimiento de GA	996 993	700 536	641 882
Total creación y mantenimiento de GA	1 588 025	1 193 692	1 276 587

ANIMALES DE LABORATORIO

PRINCIPALES CATEGORÍAS DE FINES CIENTÍFICOS

En 2017, más de dos tercios de animales se utilizaron en investigación básica o aplicada (45% y 23%, respectivamente). Un 23% sirvieron para pruebas de medicamentos y otros productos

químicos para requerimientos regulatorios (traslacional y aplicada). Y un 5% se utilizaron para la producción rutinaria (ver Figura 1).



Noticias SECAL AS NOTICIAS NOT

PRINCIPALES ESPECIES ANIMALES UTILIZADAS EN EXPERIMENTACIÓN

El 92% de especies animales utilizadas por primera vez en 2017 fueron ratones (61%), ratas (12%), peces (13%) y aves (6%). Mientras que las especies de especial interés público (perros, gatos y primates) representaron menos del 0,3% (ver Figura 2). En la UE no se utilizan grandes simios con fines científicos.

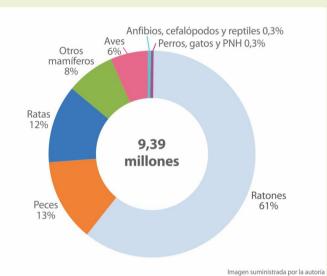


Figura 2.- Número de animales utilizados por primera vez en 2017, por clase de especie principal. Fuente: Informe Comisión Europea.

Entre 2015 y 2017, en referencia a grupos específicos de especies, el número de anfibios, cefalópodos y reptiles se redujo en un 42%, el de hámsteres en un 37%, el de caballos, burros y sus cruces en un 25%, y el de aves en un 11%. También se redujo, ligeramente, el número de perros (-6%), gatos (-5%), ratas (-5%) y peces (-4%). El número de ovinos y caprinos disminuyó en un 9%, mientras que aumentó el de bovinos (+14%). El número de primates no humanos registró un aumento del 15% y el de conejos del 2%.

ORIGEN DE LOS ANIMALES

Respecto al origen de los animales, en 2017, casi el 90% de animales utilizados para fines científicos (distintos de los primates no humanos) había nacido en la UE en establecimientos de cría registrados y menos del 2% fuera de la UE (ver Figura 3).

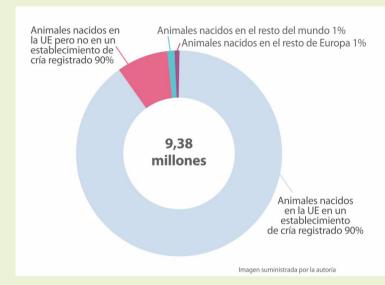


Figura 3.- Lugar de nacimiento de animales distintos de los primates no humanos en 2017. Fuente: Informe Comisión Europea.

La Directiva ofrece una protección adicional a los primates no humanos (PNH) y muestra los datos diferenciados del resto de especies. El objetivo es avanzar hacia el uso de PNH que hayan sido criados para acabar con la captura de animales en la naturaleza.

SEVERIDAD DE TODOS LOS USOS EN INVESTIGACIÓN Y ENSAYO

La legislación actual obliga a altos niveles de bienestar en la estabulación y el cuidado de los animales y promueve métodos con el menor sufrimiento posible, así como el uso del menor número de animales. La Directiva exige la comunicación de la severidad real que experimente un animal cuando se utilice en un procedimiento.

En 2017, el 51% de los usos se consideró de severidad "leve", el 32% de severidad "moderada", el 11% "severa" y el 6% "sin recuperación" (ver Tabla 4).

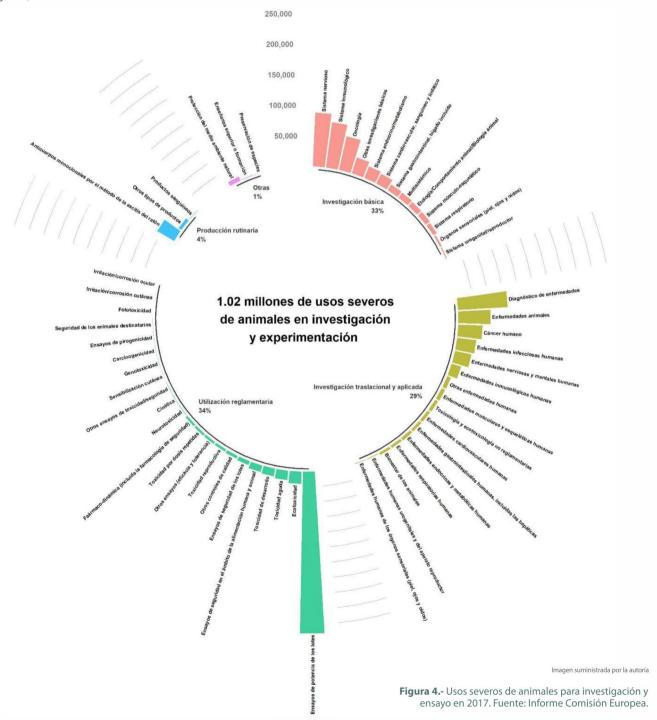
Tabla 4.- Severidad en los usos. Fuente: Informe Comisión Europea.

	2015	2016	2017
Sin recuperación	6% (622 034)	6% (620 848)	6% (621 054)
Leve (como máximo)	54% (5 330 549)	52% (5 239 321)	51% (4 865 721)
Moderada	31% (3 010 980)	31% (3 101 054)	32% (3 071 828)
Severa	8% (819 007)	11% (1 067 275)	11% (1 023 138)
Total	100% (9 782 570)	100% (10 028 498)	100% (9 581 741)

Primavera 2020. Número 85

Si se analiza el porcentaje de usos severos por subcategorías: la producción de anticuerpos monoclonales por el método de ascitis representó la utilización más alta (70% de los usos con este fin fue severo), seguida del diagnóstico de enfermedades (54%) y los estudios de toxicidad aguda en el ámbito de la ecotoxicidad (37%) (ver Figura 4).

Al analizar las subcategorías con más de 30.000 usos, la severidad más baja corresponde a la producción de productos sanguíneos, la preservación de especies, la educación y formación y los ensayos de toxicidad en relación con la sensibilización cutánea.



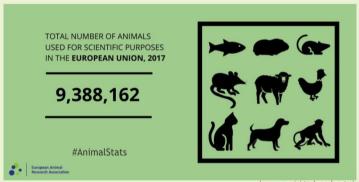
Noticias SECAL

LA UNIÓN EUROPEA MODELO DE TRANSPARENCIA EN EXPERIMENTACIÓN ANIMAL A NIVEL MUNDIAL

Este informe representa la mayor recopilación de datos realizada nunca y podría servir como modelo para otros países para mejorar la transparencia. El informe, junto a los documentos anexos con datos detallados por países, representa más de 1.000 páginas con datos en abierto. Aunque algunos científicos e instituciones también han expresado que supone una carga añadida en tareas administrativas a su labor científica.

Todos estos datos servirán para identificar con más eficacia los puntos más importantes donde se puede reducir el número y sufrimiento de los animales. Esto contrasta con las decisiones que se están tomando en los EE. UU. con planes a corto plazo para eliminar totalmente la experimentación animal en los próximos años, sin tener todavía métodos alternativos validados.

Para mejorar la comunicación de los resultados y datos del informe, la *European Animal Research Association* (EARA) ha lanzado una campaña en las redes sociales con infografías. En ellas, se muestran los datos más representativos para un público más general (ver Figuras 5-10).



lmagen suministrada por la autoría

Figura 5.-Infografía de EARA.

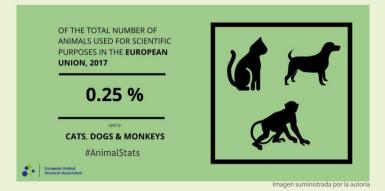


Figura 6.-Infografía de EARA.

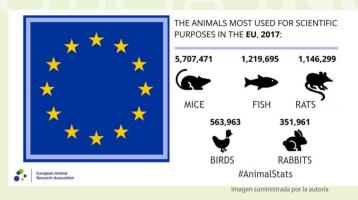


Figura 7.-Infografía de EARA.

ANIMALS BRED

BUT NOT USED



Some of the reasons why animals are bred but not used in research include:

- Animals used for breeding that undergo no procedures themselves
- Animals that are a necessary surplus resulting from breeding
- The wrong gender for a particular research study

 #AnimalStats

magen suministrada por la autoría

Figura 8.-Infografía de EARA.

European Animal Research Association

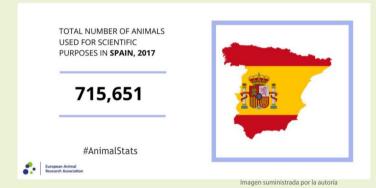


Figura 9.-Infografía de EARA.



Figura 10.-Infografía de EARA.

Noticias SECAL

ANIMALES DE LABORATORIO

Primavera 2020, Número 85

LA PRESENTACIÓN ESTADÍSTICA EN LOS PRÓXIMOS AÑOS

La modificación del apartado 2 del artículo 54 del Reglamento de la UE 2019/1010, exige que los Estados miembros remitan la información estadística por medios electrónicos en un formato resumido. Esto se verá reflejado, a partir del año 2022, en una base de datos de acceso abierto que se publicará con un informe resumido. No obstante, en aras de la transparencia que promueve la Directiva, se publicaran los datos estadísticos, anualmente, hasta 2022.

BIBLIOGRAFÍA

- Página web de la Comisión Europea con los datos estadísticos sobre animales utilizados en experimentación animal.
- Informe sobre las estadísticas relativas al uso de animales con fines científicos en los Estados miembros de la Unión Europea en 2015-2017.
- Documentos de trabajo anexos al Informe.
- Animal-research data show effects of EU's tough regulations. Nature. 12 febrero 2020.
- Scientist concerned over US environment agency's plan to limit animal research. Nature. 10 septiembre 2019.
- Nota de prensa de EARA sobre la publicación del Informe sobre las estadísticas.
- Europa se compromete a reducir los animales en investigación. Animal's Health. 6 febrero 2020.



Todo lo que necesitas saber

Anúnciate en ANIMALES DE LABORATORIO, la revista de habla hispana más importante del sector, y posiciona tus productos directamente en manos de los animalarios.



www.secal.es

Actualidad

Los animales de laboratorio ante el desafío global del coronavirus

Lluís Montoliu

CNB-CSIC y CIBERER-ISCIII

Palabras clave: vacuna, ratones, bioética.

Pacientemente enjaulados. Así es como estamos todos, con algunas excepciones, como son las de atender actividades esenciales. Como son las encaminadas a mantener el bienestar de nuestros animales de laboratorio, que siguen necesitando alimento, bebida y supervisión de su salud. ¿Cuántas veces hemos reflexionado sobre el entorno limitado, que intentamos enriquecer, de los animales de laboratorio en sus jaulas, a la hora de interpretar resultados experimentales? Ahora somos nosotros los que permanecemos enclaustrados. Por una buena razón, por un interés general que supera cualquier trastorno o fastidio individual.

El uso responsable de animales en experimentación científica sigue siendo necesario, con estricto respeto a las normas que regulan esta actividad investigadora. El uso de modelos animales cobra sentido ante desafíos sanitarios, como al que nos estamos enfrentando, actualmente, con la pandemia COVID-19 provocada por el coronavirus SARS-CoV-2. Sin vacunas y sin antivirales hace falta investigar en ambas direcciones, para prevenir infecciones y para tratar las que están ya instauradas, para impedir un desenlace fatal que se está llevando miles de personas por delante en todo el mundo, gente de todo tipo que hace apenas dos meses no podía imaginar un final más triste para su existencia.

Este nuevo coronavirus, como los anteriores SARS-CoV y MERS-CoV, proviene de alguna especie animal, todavía por definir con claridad, y ha acabado saltando a la especie humana. Del SARS-CoV-2 tenemos reportes esporádicos que indican que es capaz de infectar a felinos y mustélidos, pero no así a cánidos o aves. Ni tampoco a roedores. Y eso es un problema importante, para la necesaria validación preclínica sobre seguridad y eficacia de los prototipos de vacunas o propuestas antivirales que surjan. Afortunadamente, la investigación básica, silente y perseverante,

acude de nuevo en nuestra ayuda. Ahora sabemos que tanto SARS-CoV como SARS-CoV-2 usan el mismo receptor, ACE2, para acceder a las células epiteliales de nuestros pulmones. MERS-CoV usa otro receptor, DPP4. Adicionalmente, parece que SARS-CoV-2 puede acceder también a través de otros receptores, como CD-147/BSG (Basigina).

Las proteínas homólogas en roedores (Ace2, Dpp4 y Bsg) no son capaces de interaccionar con la envuelta de estos coronavirus. Por eso se han obtenido ratones modificados genéticamente que expresan las variantes humanas de estos genes. Hoy en día, contamos con los ratones transgénicos K18-hACE2, creados en la Universidad de Iowa (EE. UU.) en 2007, que ya son infectables tanto por SARS-CoV como SARS-CoV-2, causando rápidamente la muerte a los ratones expuestos a estos virus. Y los ratones K18-hDPP4, producidos por el mismo grupo norteamericano años más tarde, que se pueden infectar con MERS-CoV. Y hasta contamos con un ratón *knock-in* humanizado en el que se ha substituido el gen *Bsg* por su homólogo humano BSG. Todos estos modelos animales son ahora esenciales para la validación preclínica de vacunas y antivirales.

Por muchas urgencias sociales, políticas o mediáticas que tengamos, no deberíamos saltarnos los necesarios ensayos preclínicos en animales de laboratorio. Tiene que ser nuestra responsabilidad recordar a la sociedad el escrupuloso respeto que debemos prestar a todas las fases de desarrollo de una vacuna o de un antiviral, que es lo que garantiza su eficacia y, ante todo, su seguridad. Es el adecuado cumplimiento de los principios básicos de la bioética lo que, de la misma manera que las 3Rs lo son para la experimentación animal, permite asegurar que "no haremos el mal" sino "el bien", elementos clave que están en el origen de toda investigación biomédica.



Just What You'd Expect from a Solutions Provider.



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



Asocian ultrasonidos a diferentes tipos de comportamiento social en ratones

Palabras clave: ultrasonidos, vocalizaciones, ratones.

Los ratones se comunican, principalmente, mediante la emisión de vocalizaciones y de sustancias olorosas. Los ratones son capaces de percibir sonidos fuera del rango de frecuencias audibles para el hombre situado entre 19-20 kHz. Para comunicarse, los ratones emiten tanto sonidos que los humanos pueden oír como ultrasonidos inaudibles (entre 30 y 100 kHz de frecuencia).

Las vocalizaciones ultrasónicas de roedores son una herramienta clave para vincular las mutaciones genéticas con el comportamiento en modelos de ratón de los trastornos de comunicación, como el autismo.

En marzo de 2019, el ratón cantor de *Alston* o ratón de cola corta fue portada de la revista *Science*. Investigaciones en este ratón mostraron por primera vez que mamíferos diferentes a los primates pueden usar la corteza cerebral para controlar sus sonidos.

En este artículo que reportamos, el neurocientífico de la Universidad de Delaware, Joshua Nuenuebel, está empezando a descifrar el código que los ratones usan para comunicarse entre ellos. Los ratones vocalizan de una manera cuando son perseguidos, de otra diferente cuando son perseguidores, y poco cuando no están en movimiento.

Esta identificación ha sido posible gracias a que su equipo ha sido capaz de identificar con precisión qué ratón está realizando un sonido en concreto, dónde y cuándo.

Sus resultados, publicados en *Nature Neuroscience*, son una base para examinar los circuitos neuronales que vinculan las señales sensoriales con el comportamiento social.

Los humanos no podemos oír la mayoría de las comunicaciones vocales entre ratones porque ocurren en una escala que nuestros oídos no pueden captar. Gracias a ello pueden escabullirse en las casas, sótanos y almacenes sin detectar su presencia.

La investigación de los patrones de comunicación puede ayudar a los investigadores a entender la neurobiología del

comportamiento social y aportar una valiosa información, no sólo de lo que "hablan" los ratones entre ellos, sino también de los mecanismos de la comunicación humana.

Para realizar la investigación, el equipo de Neuneubel utilizó cuatro ratones (dos machos y dos hembras). Los ratones interactuaron durante 5 horas seguidas en un cubículo equipado con 8 micrófonos y una cámara de vídeo. En total repitieron este experimento 11 veces con ratones diferentes.

Observaron 6 comportamientos diferentes (ver vídeos en la información suplementaria del artículo):

- Caminar (ver vídeo).
- Círculo mutuo (ver vídeo).
- Pelea (ver vídeo).
- Macho persigue hembra (ver vídeo).
- Macho persigue macho (ver vídeo).
- Macho huye de macho (ver vídeo).

Cada micrófono capturó 250.000 muestras de sonido por segundo y la cámara 30 imágenes por segundo. Cada experimento generó más de 100 Gb de datos.

Para analizar estos datos utilizaron un software de aprendizaje específico que demostró qué sonidos específicos estaban relacionados con comportamientos distintos.

Las principales conclusiones de la investigación han sido:

- La vocalización de los ratones es diferente dependiendo si son perseguidores o perseguidos.
- La disminución del tono se relaciona con signos dominantes, mientras que el aumento del tono corresponde a signos no dominantes.
- Se relacionaron muchos sonidos con comportamientos específicos.
- Los sonidos afectan sólo a los ratones que interactúan, pero no a los que están cerca y no están involucrados en la acción.

En otro estudio, Neunuebel analizó los sonidos de hembras que interaccionaban con otros machos y con otras hembras. Y encontraron que los ratones hembras casi siempre vocalizan a distancias cortas de otros ratones, mientras que los ratones machos lo hacen a distancias variables.

Esta información recopilada, según Neunuebel, nos ayudará a comprender cómo funcionan los circuitos del cerebro del ratón, así como las rutas de los mensajes enviados, interpretados y ejecutados.

BIBLIOGRAFÍA

- Sangiamo D.T., Warren M.R, and Neunuebel J.P. *Ultrasonic signals associated with different types of social behavior of mice*. Nature Neuroscience. 2020;23:411-22.
- Carl Zimmer. Estos ratones cantan por turnos. New York Times. 04/03/2019.



Estudios de tomografía axial computarizada abdominal en roedores mediante el uso de agentes de contraste

Sierra-Palomares Y.^{1,2}, **de Francisco A.**^{1,2,4}, **Felipe M.**^{1,4}, **Calle D.**^{1,2}, **Desco M.**¹⁻⁴ **y Cussó L.**¹⁻⁴ Unidad de Medicina y Cirugía Experimental, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón

- Unidad de Imagen Avanzada, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC)
- ³ Departamento de Bioingeniería e Ingeniería Aeroespacial, Universidad Carlos III de Madrid

^⁴ Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM)

Palabras clave: CT, abdomen, contraste.

INTRODUCCIÓN

Las técnicas de imagen médica nos permiten visualizar, diagnosticar y evaluar el desarrollo de procesos fisiológicos y patológicos in vivo de manera no invasiva tanto en la práctica clínica como en la investigación preclínica¹⁻³.

Una de estas técnicas es la tomografía computarizada (CT), la cual se basa en el uso de rayos X y permite obtener información anatómica con un elevado contraste entre tejidos de distinta densidad. Lamentablemente, la zona abdominal, con predominancia de tejido blando, tiene una difícil evaluación por CT, debido a que los órganos tienen densidades similares entre sí, por lo que no hay diferencias de absorción de rayos X. En estos casos, es necesario el uso de algún tipo de agente de contraste que permita delimitar los órganos.

El problema surge a la hora de elegir el contraste, dado que podemos optar por agentes específicos para roedores, como por ejemplo eXIA™ (Binitio Biomedical, Inc.), FENESTRA® VC (Medilumine Inc) y ExiTron™ (Viscover, nanoPET Pharma GmbH)⁴ o podemos elegir compuestos clínicos como el lopamiro® (Bracco Imaging S.p.A). Los compuestos específicos para roedores presentan una ventaja frente a los compuestos clínicos y es que tienen un tiempo de circulación en sangre largo, lo que implica una lenta excreción, haciéndolos muy valiosos en el campo de la imagen cardiovascular, pero no tanto en otras aplicaciones. Su principal desventaja es su elevado coste, que limita su uso de manera rutinaria a aplicaciones sencillas como la imagen abdominal. Al contrario que los anteriores, los compuestos

clínicos son inadecuados para imagen cardiovascular por su rápida excreción (salvo que se infundan de manera constante durante el estudio⁵), pero muy versátiles en otras aplicaciones como la imagen abdominal, y su coste es muy bajo. Además de la elección del contraste, tenemos que definir, según la aplicación, la vía de administración, el volumen, la dosis, el tiempo que transcurre desde que se administra hasta que se adquiere la imagen, etc.

Este trabajo pretende describir la aplicación de los contrastes y sus vías de administración para evaluar la zona abdominal y sus patologías mediante imagen de micro CT en animal pequeño.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los procedimientos con animales se ajustan a la Directiva 2010/63 de la UE y a las normas nacionales (RD 53/2013) y fueron aprobados por los comités de ética locales y la Junta de Protección Animal de la Comunidad Autónoma de Madrid (PROEX 227/14). Los ejemplos mostrados en el artículo corresponden a ratones procedentes del animalario de la Unidad de Cirugía Experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, España (Es280790000087).

Los estudios de imagen CT se realizaron con un sistema microPET/CT (Super Argus, SEDECAL, España), con los siguientes parámetros de adquisición: corriente de 340 µA, voltaje de 40 KV, 360 proyecciones, 8 disparos y resolución de 200 µm. Se reconstruyeron mediante un método Feldkamp.

En la tabla 1 se resumen los contrastes empleados en este trabajo junto con la dosis, composición y vías de administración empleadas.

Tabla 1.- Contrastes empleados junto con la dosis, composición y vías de administración empleadas.

Contraste	Casa comercial	Composición	Dosis	Vía de administración
lopamiro®	Bracco Imaging S.p.A,	Iopamidol	4,5 g/kg	Intraperitoneal (IP) Animal despierto
Gastrolux®	Iberoinvesa	Amidotrizoato de sodio y	9,5 g/kg	Rectal (VR) Animal anestesiado
Gastrolux	Pharma S.L.	amidotrizoato de meglumina	3,5 g/kg	Oral (PO) Animal despierto
Fenestra® VC	Medilumine Inc	Base Iodada	0,4 g/kg	Intravenosa (IV) Animal anestesiado

Imagen suministrada por la autoría

APLICACIONES

Como ya hemos comentado en la introducción, una de las principales desventajas de la imagen de CT es el bajo contraste en tejido en la zona abdominal como muestra la Figura 1A, en la cual las únicas diferencias que se observan son debidas al contenido intestinal o a la presencia de aire.

A continuación, presentamos diversas aplicaciones para realzar los órganos de la zona abdominal (ver Figura 1B-G).

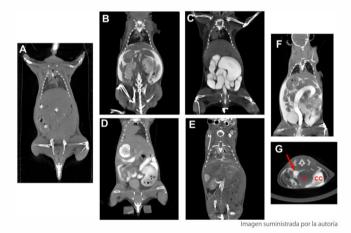


Figura 1.- Imágenes coronales (A-F) y axial (G) de CT de cuerpo entero de ratón. A. Sin la aplicación de contraste donde se indica con un asterisco (*) el contenido intestinal. B. 60 minutos después de la administración IP de 4,5 g/kg de lopamiro®. C. 30 minutos después de la administración VR de 9,5 g/kg de Gastrolux®. D. 45 minutos después de la administración PO de 3,5 g/kg de lopamiro®. E. 2 minutos después de la administración IV de 0,4 g/kg de Fenestra®. F-G. Imágenes coronal y axial tras la combinación de 4,5 g/kg de lopamiro® IP y 9,5 g/kg de Gastrolux® VR para la visualización del colon (flecha), vejiga (v) y ciego (cc).

Si deseamos delimitar los **órganos intraperitoneales** (ver Figura 1B) como los lóbulos hepáticos, estómago, riñones, intestinos, bazo, etc., procederemos a realizar una imagen 60 minutos después de la administración de 4,5 g/kg de lopamiro® IP. Recomendamos masajear la zona para la correcta distribución del contraste. En el caso de que queramos distinguir el **intestino grueso**, desde el recto hasta el ciego (ver Figura 1C), entonces adquiriremos una imagen 30 minutos después de la administración VR de 9,5 g/kg de Gastrolux®. Por el contrario, si lo que deseamos realzar es el **intestino delgado** administraremos 3,5 g/kg de Gastrolux por vía PO y se esperarán 45 minutos para adquirir la imagen (ver Figura 1D).

Por último, podemos resaltar los **vasos sanguíneos**, en este caso se ven muy bien los vasos renales y el bazo, mediante la administración de 0,4 g/kg de Fenestra® VC por IV. La imagen se realizó a los 2 minutos tras la administración, pero este contraste tiene un tiempo alto (horas) de circulación en sangre³.

En el estudio de patologías intestinales, especialmente las que afectan al **colon**, se requiere no solo realzar la estructura, sino ser capaz de visualizar las paredes de esta, para lo cual combinaremos lopamiro® IP (ver Figura 1B) con Gastrolux® VR (ver Figura 1C). De esta manera obtendremos una visualización aislada del colon (ver Figura 1F).

Este procedimiento se puede combinar con estudios de tomografía por emisión de positrones (PET) con 18F-fluorodesoxiglucosa (FDG), especialmente en modelos de colitis como muestra la Figura 2.

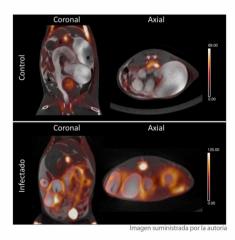


Figura 2.- Ejemplo de la aplicación en un modelo de colitis en ratón.

Presentamos imágenes fusionadas, coronales (izquierda) y axiales (derecha), de FDG-PET (en rojo) y de CT (gris). Arriba de un animal sano frente abajo de un animal infectado⁶.

Técnicas

En **modelos oncológicos** (ver Figura 3) el realce, producido 60 minutos después de la administración de 4,5 g/kg de lopamiro® IP, nos permite localizar tumores, especialmente importante cuando son internos.

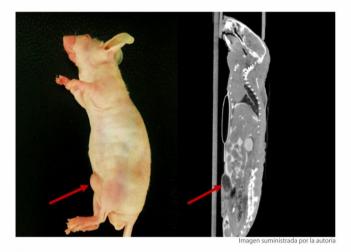


Figura 3.-Aplicación oncológica. Imagen real (izquierda) y de CT (derecha) del plano sagital de un ratón portador de un tumor (flecha).

Por último, podemos realizar estudios funcionales de **tránsito intestinal** (ver Figura 4), para lo cual administraremos 3,5 g/kg de Gastrolux® PO, y realizaremos diversos estudios de CT lo cual nos permite valorar la distribución temporal del contraste y cuantificar la cantidad de contraste en cada zona, la velocidad con la que sale del estómago y llega a otros órganos, etc.

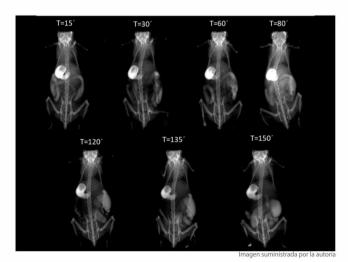


Figura 4.- Estudio del tránsito intestinal. Se muestran proyecciones coronales de máxima intensidad (MIP) del mismo animal a lo largo del tiempo (T) después de la administración de Gastrolux vía PO.

VENTAJAS Y DESVENTAJAS

Disponemos de medios de contraste habituales en clínica que tienen un bajo coste y que resultan ser de gran utilidad en estudios en investigación preclínica, como es el caso del lopamiro® y Gastrolux®. Por el contrario, los contrastes de CT de uso específico para animales de investigación, como es el caso de Fenestra® VC, tienen un alto coste y, generalmente, hay que adquirirlos en el extranjero.

La técnica de CT, complementada con agentes de contraste, ofrece la posibilidad de mejorar el bienestar animal al permitir la realización de estudios longitudinales (refinamiento), reduciendo así el número de animales utilizados en investigación (reducción) y fomentando el cumplimiento del Principio de las 3Rs.

CONCLUSIONES

El uso de contraste en CT facilita la evaluación del tejido blando abdominal, al aumentar la densidad radiográfica del tejido, permitiendo estudiar la anatomía y patologías, pudiendo, además, proporcionar información funcional, en estudios abdominales en roedores de laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

- 1. Graf K., Grafe M., and Fleck E. *Cardiovascular diseases as target for imaging*. Basic research in cardiology. 2008;103(2):82-6.
- 2. Cherry S.R. and Gambhir S.S. *Use of positron emission tomography in animal research*. ILAR journal. 2001;42(3):219-32.
- 3. Clark D.P. and Badea C.T. *Micro-CT of rodents: state-of-the-art and future perspectives.* Physica medica: PM: an international journal devoted to the applications of physics to medicine and biology: official journal of the Italian Association of Biomedical Physics. 2014;30(6):619-34.
- Mannheim J.G, Schlichthaerle T., Kuebler L., et al. Comparison of small animal CT contrast agents. Contrast media & molecular imaging. 2016;11(4):272-84.
- Nahrendorf M., Badea C., Hedlund L.W., et al. High-resolution imaging of murine myocardial infarction with delayed-enhancement cine micro-CT. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2007;292(6):H3172-8.
- Cusso L., Reigadas E., Munoz P., et al. Evaluation of Clostridium difficile Infection with PET/CT Imaging in a Mouse Model. Molecular imaging and biology. 2019;Jul 17.

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





Pausas activas en el trabajo

Jesús Martínez Palacio y María del Carmen García Ortiz

Técnicos Superiores en Prevención de Riesgos Laborales

Palabras clave: pausas, ejercicios, prevención.

En nuestro gremio hemos detectado, y ya lo hemos comentado en esta sección, que la realización de pequeñas paradas o descansos sería una excelente herramienta de prevención para muchos de los riesgos que padecemos (carga mental, carga física, posturas, manejo de cargas...).

Hoy, adaptamos un pequeño artículo que apareció en la Web de SEGURMANIA, de la Asociación empresarial vasca *ConfeBasK*, que nos sugiere un modo "creativo" de aprovechar pequeñas pausas en el trabajo.

Estamos acostumbrados a pasar muchas horas trabajando, parando muy pocas veces y por tiempos relativamente largos (30 minutos de desayuno, 1 hora para comer...).

La sugerencia es empezar a practicar pequeñas **pausas** activas en el trabajo. Van a favorecer tu salud en varios aspectos: a nivel cardiovascular, respiratorio, cognitivo y prevención de posteriores dolencias fruto de adoptar malas posturas continuadas. Y es que hacer una pausa mientras trabajas para realizar ejercicios terapéuticos tiene más beneficios de los que imaginas: disminuye el estrés, reduce la fatiga física y mental, mejora la calidad del trabajo, promueve la relajación muscular y favorece la circulación sanguínea.

¿En qué consisten las pausas activas? Se trata de una pequeña "pausa" (**rutina corta de ejercicios específicos** – no más de **5 o 10 minutos** – que se pueden realizar en el mismo espacio de trabajo) a realizar cada hora y media o dos horas. Son ejercicios **básicos y funcionales** para ejercitar los músculos, movilidad articular, de estiramiento y de relajación.

No dejes de practicar estos ejercicios que te recomendamos:

Movimientos circulares de cadera.

- Estiramientos, elevando hombros hasta los 90° y con el otro brazo ejercer leve presión en los codos.
- Girar la cabeza hacia un lado hasta que el mentón quede casi en la misma dirección que el hombro. Después realizar este ejercicio girando al otro lado. **No forzar la articulación.**
- Inclinar la cabeza hacia atrás (de nuevo **sin forzar**) y permanecer durante 30-40 segundos en esta posición.
- Encoger los hombros hacia las orejas (subirlos, como mostrando indiferencia) y permanecer en esa posición 10 segundos.
- Realizar movimientos circulares de tobillo.
- Estirar los brazos hacia el frente, juntar las palmas y mover las manos hacia arriba y abajo.
- Realizar ejercicios de relajación que consisten en inhalar y exhalar contrayendo el abdomen y relajando cada parte del cuerpo. La respiración debe ser lo más profunda, lenta y rítmica posible.

La práctica continua de las pausas activas disminuye los niveles de estrés, favorece la autoestima, mejora la concentración, reduce el riesgo de enfermedades, motiva y mejora las relaciones interpersonales, libera la tensión muscular y articular, y ayuda a realizar mejor tus tareas laborales.

¡Qué más se puede pedir!

La noticia en la web: http://www.segurmaniazurekin.eus/vidas-seguras/practica-pausas-activas-en-tu-trabajo/



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 E

BEDDING

ENRICHMENT

IDADO AL CUIDADO

Foto: shutterstock

Cultura del cuidado

Julia Sánchez García, Magdalena Jiménez Vaquero v Violeta Solís Soto

GlaxoSmithKline I+D DDW IVS&D

Palabras clave: refinamiento, cuidado, bienestar animal.

La Cultura del Cuidado (Culture of Care) es un término que cada vez se oye más en nuestra comunidad y que fue un tema central en el pasado congreso de FELASA en Praga. El término, en adelante CdC, se refiere al hecho de ir más allá en el cuidado de los animales, no actuando únicamente en el cumplimiento de la legislación, sino porque nos preocupamos genuinamente por ellos.

La Directiva Europea 2010/63/EU incluye este concepto en el recital 31, donde se menciona la responsabilidad del Órgano Encargado del Bienestar Animal de fomentar un climate of care, traducido al español como "clima de solicitud" (hacia los animales). En documentos posteriores de la Comisión Europea se subraya la importancia de establecer, mantener y promover la CdC por parte, tanto del personal responsable del bienestar animal como del Órgano Encargado del Bienestar Animal (OEBA). En este sentido, se considera que uno de los beneficios de un buen OEBA es la promoción de la CdC en el centro.

La Federación Europea de Asociaciones e Industrias Farmacéuticas (EFPIA, del inglés European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations) tiene un grupo de bienestar animal que realizó en 2017 una encuesta para estudiar el estado de la CdC en la industria europea y un taller posterior para trabajar en el concepto. A raíz de todo esto, se puso de manifiesto la necesidad de tener algún tipo de herramienta para que los centros pudieran autoevaluar su CdC. Así, el año pasado, publicaron un artículo con este fin¹, este artículo establece cinco niveles en la CdC (ver Figura 1), comenzando en los valores del centro y terminando en aspectos específicos de los procedimientos y el cuidado de los animales. En este artículo nos centraremos, sobre todo, en la parte relativa al personal.

CUIDADO AL CUIDADO



Figura 1.- Niveles de la CdC en una organización¹.

El personal técnico del animalario es la pieza fundamental para desarrollar una buena CdC. De hecho, los técnicos son el personal que dedica más tiempo a los animales y su cuidado; son los que tienen el mejor conocimiento de estos y de los procedimientos que se realizan, así como la mayor motivación para mejorar su bienestar. Sin embargo, los técnicos no pueden actuar solos, por lo que es fundamental que exista una estructura institucional que los apoye. Por ejemplo, en nuestra empresa existe una normativa interna a nivel global destinada a asegurar el adecuado cuidado y trato a los animales de investigación. Además, existe un departamento dedicado al bienestar animal y a la ética de la experimentación. Esto es posible al ser una multinacional que requiere un funcionamiento homogéneo en todos sus centros de investigación, independientemente del país en el que se ubiquen y de la legislación que les aplique.

En centros públicos y académicos, es posible que esto sea más complicado, pero es fundamental que el animalario tenga el apoyo de la dirección del centro para que pueda cuidar adecuadamente de los animales. Para el personal investigador la prioridad suelen ser los resultados experimentales antes que el bienestar animal; y como también suelen tener una mayor influencia, sin el apoyo de la dirección el animalario estará en una posición más débil. Esto en realidad perjudica a todos -incluyendo a la ciencia-, ya que las consecuencias fisiológicas, conductuales, metabólicas, etc. de un cuidado, manejo y trato subóptimos van a afectar a los datos experimentales obtenidos con estos animales, dificultando que se pueda llegar a conclusiones válidas. Si a nivel institucional no es posible tener una normativa interna que promueva la CdC, se pueden optar por otras opciones más sencillas, pero con un impacto también importante. Desde la dirección debe haber un apoyo abierto al personal del animalario, con un reconocimiento claro a su labor y a la importancia que tiene en la investigación. La creación de un reconocimiento regular a aquellos individuos que más hayan contribuido a la CdC y a las 3Rs pone el foco sobre estos temas a nivel institucional y recuerda a todo el centro la importancia que tienen; además de ser muy motivador para las personas que trabajan directamente con los animales. Este reconocimiento puede incluir la entrega de un trofeo o una placa y una pequeña ceremonia donde el personal senior agradezca públicamente el trabajo de estas personas. Por otro lado, el centro puede reconocer abiertamente el uso de animales en su página web y la importancia que tiene su uso, así como estadísticas de este, áreas terapéuticas en las que se utilizan, imágenes de las instalaciones, etc. Esto pone de manifiesto el compromiso del centro con un uso adecuado de los animales y la transparencia en su conducta. El "Acuerdo de Transparencia" firmado recientemente recoge esta comunicación institucional como uno de los pilares del acuerdo https://www.cosce.org/informe-anual-2019-del-acuerdo-de-transparencia-sobre-el-uso-de-animales-en-experimentacion-cientifica-en-espana/.

Por ejemplo, Charles River, tiene unos pósteres muy bonitos relacionados con la CdC: https://www.criver.com/about-us/about-us-overview/animals-research/humane-careinitiative?region=3696. (ver Figura 2). El centro también puede poner un poster de este tipo por los pasillos para que la gente lo vea y sea consciente de la importancia que tiene la CdC y el valor que se le da desde el centro.



It only taxes an extra minute to ensure you are owng your pio correctly. The safety of our animals is vital to research as well as our reputation. So, taxe that extra minute, step bace and evaluate the situation. Certifirm that there are no animals at risk. Take the time to do your job correctly. Because working efficiently doesn't mean compromising animal safety.



Animal Welfare is Our Passion
Imagen suministrada por la autoría

Figura 2.-Ejemplo de póster que se puede colocar en los pasillos para recordar la importancia de dar un buen trato a los animales y que muestra el compromiso del centro con la cultura del cuidado. Imagen: Cortesía de Charles River.

CUIDADO AL CUIDADO

Otro aspecto fundamental del apoyo que el centro tiene que dar al personal es permitirle formarse adecuadamente y mantenerse al día de los avances en las técnicas y en el conocimiento de los animales, para que pueda realizar su trabajo adecuadamente y tenga la confianza de poder tomar decisiones de forma autónoma en los aspectos que afectan a los animales. Obviamente, una vez que se ha invertido en ellos, debe permitírseles que desempeñen esa autonomía y capacidad de decisión. Los técnicos son los que mejor identifican cualquier problema que pueda surgir y van a ver de forma temprana cambios en los animales dada la gran experiencia que tienen en la observación diaria de los mismos. Delegar en ellos permite, además, hacer un uso más eficiente de los recursos, por lo que beneficia a todos.

El último nivel de la cultura del cuidado se refiere al trato directo que les damos a los animales. Recientemente, se ha publicado un ejemplo de cómo fomentando la cultura del cuidado se puede mejorar el manejo de los animales y los procedimientos realizados en ellos de una manera increíble: https://www.ri.se/en/what-we-do/expertises/3r-refinement.

Que el personal se preocupe por los animales y los vea como individuos y no como objetos o herramientas es necesario para poder tener una buena CdC. Sin embargo, apreciar a los animales y, a la vez, llevar a cabo un trabajo que a menudo les perjudica, puede provocar una disonancia cognitiva (contradicción entre lo que se piensa y lo que se hace) y eso llevar a lo que se denomina fatiga por compasión. Este tema se ha tratado ya en el pasado número de la revista.

Todos los animales que se encuentran bajo nuestro cuidado dependen de nosotros para que su vida sea buena. En el caso de los animales de experimentación esto es especialmente relevante, ya que en muchas ocasiones los procedimientos realizados con ellos pueden causarles malestar, dolor, miedo, etc. Debemos ser plenamente conscientes de la enorme responsabilidad que tenemos con todos y cada uno de los animales con los que trabajamos. Su destino está, literalmente, en nuestras manos, y las pequeñas decisiones que tomemos en el día a día van a ser fundamentales para su bienestar (ver Figuras 3, 4 y 5).



Figura 3.-Manejo del ratón sin utilizar la cola. **A.** Utilizando la palma de las manos. **B.** Utilizando un túnel.



Figura 4.-Es importante tratar a los animales adecuadamente para que confíen en nosotros.

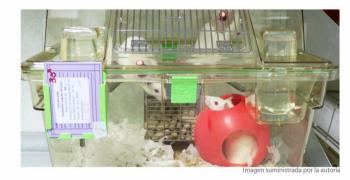


Figura 5.-La cultura del cuidado significa que vamos más allá de lo que nos pide la legislación. Jaulas de rata que doblan la altura indicada en el RD 53/2013 y que permiten que las ratas puedan ponerse de pie.

BIBLIOGRAFÍA

1. Robinson S., Sparrow S., Williams B., et al. The European Federation of the Pharmaceutical Industry and Associations' Research and Animal Welfare Group: Assessing and benchmarking 'Culture of Care' in the context of using animals for scientific purpose. Laboratory Animals. 2019. https://doi.org/10.1177/0023677219887998.





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.

¿Y tú que opinas?

Lo peligroso de..."hacer pie"

Horus Laffite Cabrera¹, Juan Antonio Díaz Garrido¹ y Tatiana Roncancio Medina²

¹ Residente de psicología, Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín

² Unidad de Investigación, Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín

Palabras clave: natación forzada, roedores, depresión.

La prueba de natación forzada (PNF)¹ en roedores es un método ampliamente utilizado tanto para la generación de estrés, como para la validación de fármacos antidepresivos. Consiste en introducir al animal de experimentación en un recipiente con agua del que no puede escapar. Tras la conducta de lucha, presentará períodos de inmovilidad característica que han sido considerados como conductas de indefensión aprendida, o desesperanza relacionadas con la depresión. La duración de esta conducta depresiva se ve modificada tras la administración de fármacos antidepresivos, los cuales aumentan la latencia y disminuyen significativamente el tiempo de inmovilidad de los animales en la prueba.

Realizamos un ensayo de PNF con tres grupos experimentales (N=12 por grupo), en un modelo de rata Sprague Dawley de entre 3 y 6 meses de edad. Dos de los grupos recibieron tratamiento con fármacos antidepresivos; el primero de ellos con fluoxetina, un inhibidor selectivo de la recaptación de la Serotonina (ISRS); el segundo recibió condesipramina, un fármaco antidepresivo con efecto sobre el sistema noradrenérgico (ISRN); mientras que el tercer grupo recibió un tratamiento control.

Los animales fueron expuestos a una prueba de natación durante 15 minutos como precondicionamiento, con el objetivo de facilitar el desarrollo de la inmovilidad. A las 24 horas, se realizó una segunda prueba de 5 minutos de duración, en la que se obtuvieron las medidas de nuestro ensayo. La administración repetida de fármacos se realizó vía intraperitoneal a las 24 h, 4 h y 60 min antes de la segunda prueba, en dosis de 10 mg/kg cada uno; mientras que el grupo control recibió dosis de solución salina al 0,9%. Las conductas de los animales fueron calificadas en dos categorías: lucha o inmovilidad. Utilizamos cilindros de plexiglás de 15 x 30 cm, que llenamos de agua hasta una altura de 15 cm.

Nuestros resultados no fueron coincidentes con la investigación previa, pues en relación con lo descrito obtuvimos puntuaciones exageradamente más elevadas en la conducta de inmovilidad en todos los grupos. Además, estas puntuaciones de

inmovilidad no diferían entre los tres grupos que evaluamos; lo esperable era que los grupos 1 y 2 (que habían recibido tratamiento) presentasen menores puntuaciones de inmovilidad que el grupo control, e incluso preveíamos ver diferencias entre dichos grupos puesto que involucran diferentes vías de neurotransmisión.

¿Y tú qué opinas?

¿Cuál puede ser la causa de las discrepancias encontradas entre nuestro ensayo y lo descrito por la bibliografía?

¿Qué propondrías para solucionar el problema?

SOLUCIÓN

La revisión del protocolo mejorado de PNF^{2,3} describe que la profundidad del agua de los cilindros es un factor importante para tener en cuenta; ya que los animales al tocar el fondo del cilindro con sus colas logran sostenerse, dando como resultado un aumento de la inmovilidad.

El tamaño del cilindro también afecta a la validez predictiva de la prueba para determinados fármacos antidepresivos. Se han descrito efectos diferenciales en las conductas de los animales expuestos a ISRS e ISRN; Detke y Lucki, en 1995, realizaron una ampliación a la clasificación de los comportamientos activos de la rata, considerando que debían de evaluarse: la natación, la escalada y el buceo. Con estas nuevas categorías, se detectó que los ISRS promovían mayor conducta de nado, mientras que las conductas de escalada y de buceo aumentaban en mayor medida con ISRN. Al aumentar el volumen del cilindro se favorece una mayor conducta de nado; pero al incrementar la altura y profundidad de éste, permite que aparezcan conductas de escalada y buceo. Por lo tanto, las dimensiones del instrumento afectan a las conductas objeto de medición, y permiten diferenciar el efecto de diferentes tratamientos antidepresivos.

Para solucionar las dificultades expuestas en este caso, es necesario tener en consideración las dimensiones del instrumento que mejor se ajusten a los objetivos de nuestro ensayo. Recordemos que cuanto mayor sea el volumen del cilindro empleado, mayor posibilidad de poder medir conductas diferenciales en la PNF. En caso de utilizar ratones, recomendamos utilizar cilindros de una anchura >10 cm (preferiblemente 15 cm), de 25 o 30 cm de altura, pero otorgando 15 cm mínimos de profundidad de agua. En ratas, recomendamos utilizar cilindros con una anchura >20 cm (preferiblemente 30 cm), con una altura de 50 cm y una profundidad de agua mínima de 30 cm (ver Figura 1).

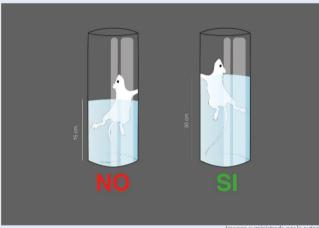


Figura 1.- Imagen ilustrativa comparando la profundidad del agua en dos cilindros. Ilustración cortesía de Miguel Martín Betancor.

BIBLIOGRAFÍA

- 1. Porsolt R., Le Pichon M., and Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. Nature. 1977;266(5604):730-2.
- 2. Detke M.J., Rickels M., and Lucki I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. Psychopharmacology. 1995;121(1):66-72.
- 3. Bogdanova O.V, Kanekar S., D'Anci K.E, et al. Factors influencing behavior in the forced swim test. Physiology and Behavior. 2013;118:227-39.



Control sanitario

Bases de la evaluación y seguimiento sanitario en instalaciones de pez cebra para investigación

Francesc Padrós Bover¹ **y Juan Ramos Blasco**²
'Servicio de Diagnóstico Patológico en Peces, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona

Palabras clave: pez cebra, patología, control sanitario.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el crecimiento del uso del pez cebra (Danio rerio), o zebrafish como comúnmente se le conoce en experimentación animal, ha sido exponencial y se ha acompañado de un desarrollo extraordinario tanto en la tecnología de investigación aplicada como de los ámbitos en los que se usa de modelo.

Entre otras, una de las ventajas que ofrece el modelo de pez cebra es la relativa simplicidad que tiene el mantenimiento y reproducción de las diferentes líneas y cruces. Por desgracia, esta aparente mayor simplicidad ha conllevado a no considerar la importancia de la salud y la calidad sanitaria de los peces destinados a investigación. En otro tipo de modelos de vertebrados terrestres el control sanitario de los animales forma parte, fundamental, de la gestión global en los animalarios y, por lo tanto, no existen razones para que no lo sea también en el modelo de pez cebra.

Los principios y objetivos en los que se basa el control sanitario en especies terrestres y acuáticas son muy parecidos, pero las bases de la gestión sanitaria presentan notables diferencias. En este artículo estableceremos las bases y recomendaciones sobre las que se deberían implementar los planes de vigilancia y gestión sanitaria en este tipo de instalaciones, de forma similar a lo que otros autores también han reflejado¹⁻⁴. Aparte de estas recomendaciones, es importante también destacar que desde working groups específicos de FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) y AALAS (American Association for Laboratory Animal Science) se están diseñando actuaciones para mejorar la estandarización de las técnicas de diagnóstico en instalaciones.

PRINCIPIOS Y OBJETIVOS DEL CONTROL SANITARIO EN **COLONIAS DE PEZ CEBRA**

Los principios fundamentales para conseguir colonias o poblaciones de pez cebra saludables y libres de enfermedades se basan en estos tres conceptos: capacidad de adaptación, resistencia y recuperación; bienestar; y minimización de interferencias por presencia de patógenos.

Capacidad de adaptación, resistencia y recuperación

El término anglosajón resilience hace referencia a la capacidad de los organismos y ecosistemas de soportar y recuperarse de cambios desestabilizantes. Por tanto, estos conceptos se asocian a la genética propia de los peces y a condicionantes, también propios, como la correcta nutrición de estos o la adquisición de características que los pueden hacer más adaptables o resistentes.

Respecto a la genética, hay que asumir que precisamente una de las características del pez cebra en investigación es la capacidad de poder mantener y operar con múltiples líneas de background genético. Esa característica puede influir de forma relevante en la resiliencia de esos animales, ya que la selección o manipulación genética se orienta hacia objetivos, generalmente, muy distintos a la selección que se obtendría, por ejemplo, en el medio natural o la que se obtendría con una selección dirigida a obtener ejemplares mejor adaptados a determinadas condiciones de producción. Por lo tanto, la resiliencia fisiológica de líneas wild type (WT) suele ser mayor que la de líneas muy seleccionadas para un determinado gen, característica, etc. Es importante tener en cuenta que en el background genético de las líneas no existan problemas de consanguinidad o escasa

²Veterinario de Animales acuáticos, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Inmunologia, Universitat Autònoma de Barcelona

diversidad genética en el stock, que puedan llevar a convertirlas en líneas poco tolerantes a los posibles cambios en el sistema.

El otro factor en juego es la nutrición⁵. Para conseguir una capacidad máxima de adaptación y respuesta es necesario que los requerimientos nutricionales estén adecuadamente cubiertos, incluyendo los requerimientos en cada edad (larvas, alevines, adultos) y momento específico de su ciclo de vida (reproducción). También se debe valorar la utilización de recursos nutracéuticos (boosters de vitaminas, uso de inmunoestimulantes, prebióticos, probióticos) para reforzar, especialmente, el sistema inmune a través de la alimentación.

Finalmente, es importante considerar la inmunoprofilaxis (vacunación), para incrementar el nivel de protección de las poblaciones mantenidas en las instalaciones, de forma similar a como se trabaja en campos como la piscicultura. Si bien, al incluir en la gestión de stocks y de instalaciones elevados niveles de prevención y bioseguridad, las vacunas no suelen ser necesarias.

Bienestar

El bienestar animal en el ámbito del pez cebra está comparativamente menos desarrollado que el de otros modelos animales de investigación ^{6,7}. En el caso de peces mantenidos en acuarios o sistemas de recirculación, las condiciones del agua han sido las que se han considerado, al estar directamente implicadas en ese bienestar y en el mantenimiento de la fisiología. Si bien, además de las condiciones del agua, hay que considerar otros factores relacionados, por ejemplo, con el manejo de los animales: densidades de cría, tamaño, dispersión de tallas, mantenimiento para cada estadio de desarrollo, iluminación o enriquecimiento ambiental. En las recomendaciones, recientemente, publicadas por el working group de FELASA se establecen los valores adecuados para el mantenimiento de pez cebra, minimizando el estrés⁸ (verTabla 1).

Tabla 1.- Resumen de las recomendaciones de FELASA⁸.

	Valor	Otros
Temperatura	24-29 °C	
Fotoperiodo	14 luz:10 oscuridad	554-3344 lux
Cloro	0 ppm aireación	Cloraminas carbón
Conductividad	1510-1500 μs	
КН	3-8°	Normal 4-5
GH	3-8°	Normal 4-5

	Valor	Otros
pH	>7	
Amoniaco	<0,1 ppm	Análisis semanal
Nitritos	<0,3 ppm	Análisis semanal
Nitratos	<25 ppm	Análisis semanal
Densidad	4-10 peces/l	
Enriquecimiento	Artemia	Plantas individualizadas

Imagen suministrada por la autoria

El estrés individual de los peces puede, fácilmente, convertirse en estrés colectivo, ya que, recientemente, se ha descrito la relevancia de los niveles de cortisol en agua como causa de producción de un estado de estrés sincitial⁹.

Minimización de interferencias por presencia de patógenos

Muchas de las enfermedades a las que el pez cebra puede estar expuesto están, directamente, relacionadas con la bioseguridad de los sistemas, al ser en su mayoría, enfermedades de origen infeccioso o parasitario. Por lo tanto, y por su relevancia, este va a ser uno de los aspectos que más se va a repetir y comentar en los siguientes puntos.

BASES DE LA GESTIÓN DE LA SALUD EN COLONIAS DE PEZ CEBRA

Calidad del medio/calidad del agua

Como hemos comentado anteriormente, en cualquier instalación de pez cebra, para investigación, es fundamental un control del agua de forma continua y precisa. En la adecuación y estabilidad de los diferentes factores o parámetros del agua estarán, por tanto, las bases del éxito.

Hay patologías no infecciosas debidas a los parámetros fisicoquímicos del agua. Así, por ejemplo, ciertas concentraciones de valores nitrogenados; ya sea en forma de amoniaco (alteración estructural de las branquias, toxicidad general), de nitritos (generación de metahemoglobina) o de nitratos (disminución de los índices zootécnicos) provocan alteraciones en los peces. El pH es otro de los factores más importantes para tener en cuenta, por su efecto directo en el mantenimiento del pH interno de los peces y de su homeostasis. También, hay otras patologías que tienen su origen en la rápida fluctuación de los parámetros, imposibilitando la adaptación de Danio rerio a los mismo; como, por ejemplo, la temperatura. Asimismo, la presencia de poros en las conducciones o la falta de ajuste en las juntas en los sistemas de bombeo a presión puede generar sobresaturación de nitrógeno y facilitar la generación de embolias gaseosas en el pez cebra, causando una elevada mortalidad. Aunque hemos presentado estos factores fisicoquímicos de forma muy breve y simplificada, el seguimiento y control de estos, en

Control sanitario

muchos casos, requiere un conocimiento mucho más exhaustivo y experiencia. Por la relevancia que tienen, y también por la muy frecuente implicación directa e indirecta de estos cambios en otras patologías, es necesario insistir en su importancia.

Alimentación

La alimentación y nutrición se deben adecuar a cada una de las fases de desarrollo, tanto en su composición, forma de presentación, cantidad y forma, como en su frecuencia de distribución. Existen en el mercado dietas diseñadas para peces ornamentales, además de dietas específicas para pez cebra, con un adecuado balance nutritivo y tratamientos que evitan la lixiviación de los nutrientes y su alta disponibilidad. Huelga decir que hay que preservarlos en ambiente fresco, seco y oscuro para evitar su deterioro y evitando que se humidifiquen, lo que favorece su oxidación y provoca la proliferación de hongos. Además del uso de alimento seco como dieta base también se puede usar alimento vivo como Artemia, lo que les proporciona, además, enriquecimiento ambiental. Para las primeras fases larvarias y antes que puedan ser utilizados los primeros piensos de arranque, suele ser necesario el uso de alimento vivo en forma de infusorios, rotíferos o nauplios de Artemia. En estos casos, es necesario disponer en las instalaciones de cultivos auxiliares (infusiorios, rotíferos) o de sistemas de eclosión/descapsulación de quistes de Artemia. Estos sistemas pueden ser fuente de microorganismos, algunos de ellos potencialmente patógenos. Por ello es necesario aplicar medidas de control microbiológico en los cultivos y equipamiento y lavarlos con abundante aqua limpia. Aun así, solamente se consigue una higienización de este alimento vivo, no una desinfección absoluta, lo cual no evita el riesgo de patógenos, como se ha demostrado con Mycobacterium sp. 10.

Calidad microbiológica

Desde el punto de vista microbiológico, las instalaciones deberían presentar una estabilidad de la cantidad de microorganismos por unidad de volumen de agua y de la composición de esta microbiota. Esto nos dará una idea de la eficiencia de nuestros sistemas de desinfección (ultravioletas) y de los protocolos de limpieza (eliminación de biofilm y sólidos) y de la "madurez" (en el sentido de estabilidad) del sistema. El agua de los sistemas no puede ser nunca estéril (salvo en instalaciones gnotobióticas) ya que buscamos el asentamiento tanto de bacterias desnitrificadoras (nitrosomonas y nitrosobacter) en biofiltros, como de un equilibrio entre todas las poblaciones microbianas, evitando la proliferación incontrolada de los microorganismos o desequilibrios en los mismos. En este sentido, el equilibrio microbiológico está más cercano al concepto de SPF (Specific Pathogen Free, libre de patógenos específicos) del sistema que no un sistema libre o pobre en bacterias. Hay que tener en cuenta que ciertos patógenos como el Mycobacterium sp. son muy frecuentes en los medios acuáticos naturales.

Tecnología y diseño de los sistemas de recirculación de agua, calidad del medio y relación con aspectos sanitarios

Las colonias de pez cebra, habitualmente, se mantienen en sistemas de recirculación de agua (RAS, del inglés *Recirculation Aquaculture System*) muy eficientes con limitada renovación de agua. Estos sistemas distribuyen y dirigen el agua de los distintos tanques a través de una única filtración central, lo cual, en caso de problemas, puede favorecer la distribución de los patógenos entre los distintos tanques pertenecientes al mismo sistema. Aunque estos sistemas cuentan con elementos para combatir esta vectorización de los patógenos, cómo la filtración mecánica acoplada a desinfección mediante las lámparas ultravioletas, la existencia de biofilms en conducciones, biofiltros y superficies de los tanques puede permitir su acantonamiento.

Existen sistemas de circuito abierto en los cuáles el agua, tras entrar en el tanque, es eliminada como efluente sin tener contacto con otros tanques y así se evita la vectorización. Estos sistemas requieren una fuente de agua con una alta calidad fisicoquímica y microbiológica. Si bien, en estos casos y dependiendo de la fuente de agua, la biocontención puede llegar a ser más complicada de mantener frente a sistemas de recirculación.

Diseño de las instalaciones y relación con la gestión sanitaria: cuarentena

La existencia de una cuarentena en las instalaciones permitirá la recepción de huevos, adultos o juveniles, y su aislamiento respecto al resto de stocks ya presentes en la instalación. El establecimiento de una cuarentena es una medida asumible, ya que, logísticamente, se puede organizar en poco espacio y hasta en pequeños acuarios individualizados con sistema de filtración independiente. La cuarentena permite establecer un "tampón" temporal, que nos permitirá mantener el nuevo stock mientras se comprueba que su estado sanitario es el correcto y se valida su incorporación al resto de los stocks. Aún hoy en día, una gran mayoría de los certificados sanitarios de pez cebra suelen aportar escasa información sobre la calidad sanitaria y los métodos empleados para evaluar el estado sanitario del centro proveedor y/o del stock enviado. Estos protocolos y certificados no están suficientemente estandarizados y pueden ir desde una simple observación visual de los peces, hasta protocolos mucho más exhaustivos con empleo combinado de técnicas de histología, PCR y microbiología. Por ello, en muchos casos, no podemos asegurar ni un estatus sanitario definido, ni una homogeneidad en los certificados sanitarios.

La ubicación de las cuarentenas debería limitarse a salas exclusivas, con acceso restringido, a fin de evitar contaminaciones cruzadas. En el caso que la cuarentena esté en la misma sala que los otros sistemas hay que establecer una barrera física que aísle dicho

sistema. A diferencia de los animalarios tradicionales de roedores y otros mamíferos, el aire no ejerce de vector de transmisión ya que sólo algunos hongos serán capaces de colonizar el agua a través del aire. Pero una vez superada la interfase aire-agua, los patógenos son diseminados a través del agua.

Diseño de instalaciones y operaciones: aspectos de bioseguridad y prevención general

El diseño de unas rutinas de trabajo adecuadas permitirá mantener los estatus sanitarios de cada una de las poblaciones. Estas son algunas de las recomendaciones más relevantes:

- El personal que trabaja en cuarentena no debería trabajar también en los sistemas principales; o en su defecto que lo haga al final de la jornada: trabajando siempre desde la zona de mayor bioseguridad a la de menor nivel de bioseguridad. Limitar el número de personas que trabajan y manipulan los peces de cuarentena.
- Lavar y desinfectar las manos y calzado (pediluvios) antes y después de trabajar en cuarentena. Los desinfectantes de base alcohólica son bastante efectivos y de rápida actuación ayudando al secado de las manos y las superficies. Así mismo habrá que descartar los guantes tras su uso en cuarentena.
- Mantener secas las zonas de trabajo (por ejemplo, usando colectores emparrillados), así como lavarlas y desinfectarlas antes y después de trabajar en ellas (con bases alcohólicas preferiblemente).
- Identificar el material propio (por ejemplo, con un código de colores) de las cuarentenas para evitar su uso en otras zonas. Así mismo los tanques (de mantenimiento y cruce) deberán limpiarse y desinfectarse de tal manera que no entren en contacto con el material de los sistemas principales (por ejemplo, en la máquina de limpieza) o en su defecto desinfectarse tras su uso.
- Las distintas fuentes de alimento también pueden ejercer como vector de contaminación por lo que se les ha de prestar especial atención. Especialmente complicada es la gestión de los cultivos auxiliares (artemia, rotíferos o paramecios) ya que se suele realizar en la misma sala que las de las otras poblaciones. Por ello, es importante establecer un sistema de control de ejecución de protocolos y un sistema de calidad microbiológica de forma periódica.
- Limitar el tiempo de estancia en cuarentena y el uso de los animales, a fin de minimizar su manipulación. A partir del año los peces se hacen más susceptibles a las infecciones y aumenta la

probabilidad de que se conviertan en portadores asintomáticos de enfermedades crónicas (micobacteriosis, microsporidios...) aparte que disminuye su *performance* reproductiva por lo que se debería controlar los stocks que superen esta edad.

- Implementar las rutinas de limpieza en las cuarentenas a fin de minimizar el desarrollo de biofilm en el sistema de recirculación, tanto en conducciones como en los tanques. Dentro de las posibilidades de la instalación, tener previstos sistemas duplicados para poder realizar vacíos sanitarios parciales (rack) con cierta periodicidad. Estas paradas y vacíos sanitarios son muy recomendables para reducir la perpetuación de patógenos en el sistema y permiten realizar puestas a punto y reparaciones en mejores condiciones.
- Retirar los animales sintomáticos o con alteraciones (baja condición corporal, deformidades...) y moribundos del sistema, aprovechando para hacerles la correspondiente valoración sanitaria y entrada de la información en la base de datos del stock.
- Mantener las filtraciones y sus repuestos aislados de los otros sistemas de recirculación. También hemos de tener en cuenta los sistemas de tratamiento y aporte de agua y la posible contaminación de estos.
- Por último, la cuarentena puede ser de circuito cerrado independiente o de circuito abierto, lo que evita la recirculación de los patógenos entre los distintos tanques; aunque, como se ha mencionado antes, hace muy difícil asegurar una calidad de agua óptima.

Reproducción y medidas sanitarias

Estas medidas nos permitirán disminuir el riesgo de transferencia y diseminación de organismos (virus, bacterias, protozoos) potencialmente patógenos desde los stocks de reproductores a otros sistemas de manera involuntaria.

A veces es necesario mover líneas de peces desde un sistema a otro, ya sea desde la cuarentena u otro sistema, a fin de realizar los experimentos. La primera medida será intentar pasar las líneas en forma de huevos (menos probabilidad de presencia de otros organismos) y usando siempre agua limpia, estableciendo así otra barrera más. En el caso de querer testar la presencia de patógenos en los huevos mediante técnicas moleculares, hay que tener en cuenta que las técnicas de diagnóstico molecular por PCR en huevos y embriones de pez cebra suelen tener problemas a nivel de extracción de ácidos nucleicos debido al alto contenido de lípidos del vitelo, lo cual dificulta este tipo de evaluación. Alternativamente, podemos tomar ciertas medidas que minimicen la transmisión de los patógenos como por ejemplo la desinfección externa de los huevos

Control sanitario

con lejía (bleaching) o mediante la inseminación artificial, que permite una extracción más aséptica de oocitos y esperma. Es importante recordar que, en todo caso, la desinfección será a nivel de patógenos que puedan estar en la superficie del huevo (presencia en líquido ovárico en la hembra o contaminación por el medio durante la puesta) y que no es eficaz para patógenos que pueden estar en el interior del huevo, como *Pseudoloma*. Sin embargo, la eficacia de la lejía parece que puede ser menor a la de otros desinfectantes como el yodo según los últimos estudios realizados¹¹. En acuicultura, el uso de yodo como desinfectante de huevos es mucho más habitual e incluso se obtienen buenos resultados usando otros desinfectantes como el Bronopol.

Una vez estén los embriones en los sistemas principales y en la medida que estos constituyan una población sanitariamente hablando, habrá que seguir aplicando las medidas anteriormente enunciadas, a fin de mantener el estatus sanitario definido. Esto requiere que todo el personal que acceda a las instalaciones sea conocedor y cumplidor de los protocolos establecidos.

De igual manera se debe disponer de salas adjuntas a las colonias de zebrafish como laboratorio de microscopía, microinyección y zonas experimentales, que minimizan el acceso a las salas de mantenimiento de los peces.

Evaluación de la calidad sanitaria de los stocks

Existen diferentes formas de chequear el estatus sanitario, incluyendo tanto el tipo de análisis (histopatología, PCR, microbiología...) cómo el tipo de muestra a tomar: peces de la colonia, peces centinela, muestras ambientales. No hay que olvidar que, al chequeo de las poblaciones residentes en el sistema, deberemos sumar la de todas aquellas nuevas aportaciones de peces y material biológico.

El uso de animales centinelas es, particularmente, interesante y fácil de tener en las instalaciones. La ubicación preferente será en los colectores de las prefiltraciones, donde se unen los efluentes de todos los tanques y estarán más expuestos a patógenos. Estos centinelas deberán permanecer al menos tres meses en los colectores, recomendándose que además tengan una edad superior al año, ya que también aumenta la prevalencia y la expresión de ciertas patologías crónicas como *P. neurophila*.

Actualmente, existe un grupo de trabajo de FELASA y AALAS⁸ que se encuentra estableciendo unas recomendaciones para la elaboración de los *health report* y el estatus sanitario SPF. Las primeras conclusiones de este grupo parecen augurar que este estatus incluirá a aquellas poblaciones que hayan dado negativo durante 6 trimestres a *Pseudoloma neurophila*, *M. haemophilum*, *M. marinum y Pseudocapillaria tomentosa*. Esto permitirá ir homogenizando los informes y analíticas sanitarias de pez cebra y estandarizar aún más este modelo animal.

Así mismo los protocolos de monitoreo establecidos deberán adaptarse a la coyuntura de la instalación. Por ejemplo, si se detectan problemas tales como un aumento en la mortalidad de los animales o cambios susceptibles de ser provocados por enfermedades infecciosas o no infecciosas, deberá procederse a realizar chequeos específicos directamente en la población, tanto sobre animales sospechosos (muestreo dirigido) como sobre animales al azar (muestreo no dirigido) para tener datos sobre prevalencia del problema en la población. Por otro lado, el uso de la histopatología permite detectar otros problemas no infecciosos como tumores, inflamaciones asociadas a los huevos (nefrocalcitosis), megalocitosis hepática, hipertrofia epitelial de las branquias de diversa etiología, como se puede ver en la siguiente sección. Recordemos que el control de la paramétrica del agua y su análisis nos aportarán información muy importante, como ya hemos visto también en apartados anteriores

La recepción de animales puede suponer siempre un riesgo de contaminación e introducción de patógenos. En el caso que los certificados de origen no ofrezcan suficiente información o credibilidad o que los centros de origen no dispongan de acreditaciones sanitarias suficientes, se deberían chequear siempre todas las importaciones. En la actualidad, la falta de proveedores acreditados libres de patógenos y el hecho que durante muchos años no se haya considerado el riesgo sanitario en los intercambios de huevos y peces hace que siga siendo necesario tener en cuenta el alto riesgo de dispersión de los patógenos entre las instalaciones.

PRINCIPALES PATOLOGÍAS Y PATÓGENOS

En la actualidad, existe información suficiente sobre patologías en pez cebra. Entre los artículos de revisión y técnicos más generales, destacaríamos los siguientes: Crim and Riley¹², Westerfield¹³, Collymore *et al*.¹⁴ y Kent *et al*.¹⁵

En las siguientes dos tablas (ver Tablas 2 y 3) se indica una relación de las enfermedades de origen infeccioso y no infeccioso indicadas en la literatura o con cierta relevancia conocida.

Tabla 2.-Enfermedades infecciosas en *Danio rerio*. *Enfermedades típicamente de peces ornamentales.

Enfermedad	Agente
ISKN ¹⁶	Infectious Spleen and kidney Necrosis Virus
Infección por zebra <i>fish</i> picornavirus-1 (ZfPV-1) ¹⁷	Zebrafish picornavirus-1 (ZfPV-1)
Aeromonosis ¹⁸	Aeromonas sp. Aeromonas hydrophila
Flavobacteriosis ¹⁹	Flavobacterium columnare

Enfermedad	Agente
Aerocistitis ¹⁵	Aeromonas sp.
Infecciones por <i>Edwarsdiella</i> ictaluri ²⁰	Edwarsdiella ictaluri
Enteritis bacteriana en larvas	Bacilos gran-negativos, no identificados (Padrós, obs. Personal)
Micobacteriosis 21,22,23	Mycobacterium sp. Mycobacterium abcessus Mycobacterium chelonae Mycobacterium fortuitum Mycobacterium haemophilum Mycobacterium marinum Mycobacterium peregrinum
Infecciones por Lecytophora mutabilis ²⁴	Lecytophora mutabilis
Saprolegniosis ²⁵	Saprolegnia sp. Saprolegnia brachydanis Achlya sp.
Oodiniosis*	Piscioodinium/Oodinium
Punto blanco*	Ichthyophthyrius multifiliis
Escuticulociliatosis*	Tetrahymena
Infecciones por microsporidios ²⁶	Pseudoloma neurophila
Infecciones por mixosporidios ²⁷	Myxidium streisingeri n. sp. Otras especies de mixosporidios
Infección por nematodos 28,29	Pseudocapillaria tomentosa

Tabla 3.-Enfermedades no infecciosas¹⁵ y observaciones personales del autor.

Enfermedad no infecciosa	Observaciones autor
Malformaciones y problemas esqueléticos	Acortamiento opercular Braquignatia, prognatia Cifosis, lordosis, escoliosis
Malformaciones cardíacas y problemas renales	Miocardiopatia con dilatación cardíaca y efusión pericárdica Nefrocalcinosis
Neoplasias y alteraciones relacionadas	Megalocitosis hepática Hipertrofia de glándula ultimobranquial Neoplasias hepáticas: colangiomas, adenomas, adenocarcinomas Fibromas/sarcomas Seminomas Carcinomas intestinales Melanomas Linfosarcomas
Problemas reproductivos	Bloqueo ovárico

De todas estas patologías, destaca el relativamente escaso número de virus descritos afectando a colonias de pez cebra y que no corresponde a su potencial susceptibilidad a infecciones experimentales con virus de otras especies¹².

Aparte de estas patologías o potenciales patógenos, en la bibliografía pueden encontrarse múltiples ejemplos de investigación sobre patógenos relevantes en medicina humana y veterinaria (incluyendo tanto vertebrados terrestres como acuáticos) en los que se usa el pez cebra como modelo experimental. Estas citas, no corresponden a eventos patológicos detectados en instalaciones de pez cebra sino a infecciones experimentales. En todo caso, la versatilidad de los peces cebra como modelo frente a patógenos animales indica también la existencia de riesgo de que estos patógenos puedan llegar a ser patógenos de la especie, si no se mantienen correctamente las medidas de bioseguridad.

Entre todas estas patologías es importante destacar que un número relativamente importante de estas enfermedades en la actualidad se detectan muy raramente. En los principios de la investigación con pez cebra, los stocks de animales se originaban a partir del mercado de peces ornamentales. Esos peces tenían patologías habituales de peces ornamentales, incluso algunas particularmente frecuentes de peces salvajes. Al empezar a desarrollarse centros de mantenimiento y reproducción específicos, con mayores niveles de bioseguridad, muchas de esas patologías redujeron su prevalencia hasta, prácticamente, desaparecer. Solamente aquellas que por su naturaleza siguen siendo difíciles de eliminar o erradicar, siguen siendo las más prevalentes en las instalaciones de mantenimiento de pez cebra para investigación. Este sería el caso de *Pseudoloma neurophila* o de las Micobacteriosis.

En el caso de *P. neurophila*, el hecho de su alta prevalencia se asocia a su transmisión vertical. Es decir, su localización en el interior de los oocitos hace que sean refractarios a cualquiera de los tratamientos externos habituales (*bleaching*). El movimiento de líneas entre instalaciones y la facilidad de intercambio a través de huevos son, probablemente, uno de los factores que más ha facilitado su presencia y el aumento de nuevos casos de positividad.

En el caso de las micobacterias, también se ha descrito infección intraovárica y no se descarta la posibilidad de transmisión vertical²⁶, pero, probablemente, su presencia en los acuarios se deba a su ubicuidad y permanencia en el medio ambiente y alta presencia en biofilms. La presencia de patógenos, además, puede poner en riesgo el desarrollo de las investigaciones, ya que puede alterar significativamente la respuesta de los animales en los ensayos o bien puede ser una fuente de interferencia por presencia de material biológico extraño (genético, proteínas) en los animales testados.

Control sanitario

TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE PATOLOGÍAS Y DE AGENTES PATOLÓGICOS.PROTOCOLOS DE EVALUACIÓN

Generalidades

El poder mantener unas instalaciones controladas y/o libres de patógenos requiere la evaluación exhaustiva del estado de las instalaciones y el establecimiento de un plan de control sanitario, en el que figuren también todas las medidas y protocolos de bioseguridad, chequeos sanitarios periódicos y estrategias para garantizar un adecuado estado de salud de los animales.

En muchos casos, las alertas generadas por la detección de un problema concreto (morbilidad o mortalidad en aumento, problemas en la producción, problemas con los animales en determinados experimentos...) llevan a plantearse la necesidad de un mayor nivel de control y/o bioseguridad en las instalaciones. Ante esta situación y antes de tomar cualquier decisión es necesario conocer las condiciones generales de la instalación. Para ello es importante disponer del historial sanitario previo y resultados de los protocolos existentes y, a partir de estos datos, realizar las actuaciones diagnósticas necesarias para poder complementar la información existente.

A partir de las bajas, animales eliminados, necropsias y diagnósticos realizados, su análisis y el resto de los datos de la instalación (crecimiento, alimentación, parámetros de agua, parámetros reproductivos, etc.) será posible realizar una primera valoración.

Una vez analizados estos datos y en base a las desviaciones observadas, los riesgos y problemas detectados y los objetivos de mejora, se pueden diseñar protocolos específicos para detectar la presencia de determinados patógenos y su prevalencia. Esta estrategia, practicada de forma sistemática y en el tiempo es la que permitirá conseguir niveles SPF en las instalaciones.

Técnicas de detección de patologías

Como se ha indicado anteriormente, el "estado de salud" genérico o de base de una instalación se puede evaluar, indirectamente, a través de la evaluación de los datos de funcionamiento (performance) del propio sistema (crecimiento, morbilidad, mortalidad, supervivencia, prolificidad de los reproductores...), juntamente con los datos obtenidos de la patología de peces moribundos o de peces que por su condición se considere necesario eutanasiar. Para estudios destinados a detectar la presencia y calcular la prevalencia de determinadas

enfermedades en las instalaciones, es necesario realizar estudios dirigidos específicos, teniendo en cuenta la disposición de los racks y circuitos, la distribución de las poblaciones, su número y otras consideraciones de carácter epidemiológico.

La aproximación diagnóstica puede realizarse utilizando diferentes tipos de pruebas de mayor o menor complejidad, especificidad y/o valor diagnóstico en función de factores como experiencia, tiempo o valor económico de las mismas. De forma resumida, estas son los diferentes tipos y categorías de pruebas: pruebas de diagnóstico general (directas rápidas y histopatología), pruebas indirectas y pruebas específicas para patógenos.

Pruebas de diagnóstico general

Las pruebas de diagnóstico general son las que habitualmente se realizan en los muestreos de rutina. Se trata de pruebas sencillas y rápidas que pueden permitir una primera aproximación diagnóstica, generalmente, de carácter orientativo y en algunos casos, identificar la presencia de bacterias y/o parásitos en las lesiones. Estas pruebas rápidas se basan en la observación de lesiones macroscópica externas y en la necropsia, preparaciones en fresco de branquias y raspados de piel y también squashes e improntas de órganos. En estos casos, es importante realizar una evaluación inmediata postmortem, ya que los procesos de auto y heterolisis son particularmente rápidos, debido al tamaño reducido de los peces y a la temperatura a la que se mantienen.

Otro método de diagnóstico habitual es la realización de estudios histopatológicos. La evaluación de secciones de pez cebra proporciona información de múltiples órganos, de los cambios y lesiones existentes y evalúa de forma más precisa las diferentes patologías observadas. Para ello, es necesario obtener una buena calidad y fijación de la muestra, por lo que siempre deben utilizarse peces eutanasiados o con un *postmortem* menor a 10 minutos. También es muy importante que la evaluación sea realizada por patólogos con formación y experiencia en patología de pez cebra.

Pruebas indirectas

En algunos casos pueden utilizarse técnicas indirectas como la evaluación de muestras de sangre y la evaluación de material procedente de las instalaciones (biofilms bacterianos a partir de superficie, materia orgánica, heces) para mejorar la precisión de la evaluación. En este sentido, las técnicas moleculares en las que se

puede detectar la presencia de patógenos fuera del pez o en formas de resistencia en el medio^{30,31,32} son muy interesantes.

Pruebas específicas

Una vez se dispone de la sospecha o confirmación de la existencia de patologías con una causa o agente concreto, pueden aplicarse diferentes tipos de aproximaciones diagnósticas específicas.

Para el caso de problemas infecciosos o parasitarios, los abordajes diagnósticos son muy parecidos a los que se pueden realizar en otros animales de experimentación y se basan en técnicas generales de aislamiento y detección de virus (cultivos celulares), bacterias/hongos (cultivos microbiológicos, aislamiento e identificación) o parasitarios (identificación por características morfológicas), complementados o no mediante técnicas moleculares (PCR, qPCR)²⁶ o técnicas específicas combinadas con otras técnicas (IHC, ISH), entre otras. En estos casos, también es recomendable que se seleccionen laboratorios con experiencia en el desarrollo de estas técnicas para patógenos específicos de pez cebra.

Para el caso de problemas no infecciosos, la aproximación diagnóstica puede ser mucho más compleja debido a que están mucho menos caracterizados. En algunos casos puede ser necesario realizar análisis de tipo toxicológico para confirmar o descartar la presencia y efectos de xenobióticos en el sistema, problemas de origen nutricional (deficiencias nutricionales) o genético.

INTEGRACIÓN, PROPUESTAS Y MODELOS

La calidad sanitaria de una colonia de pez cebra no depende exclusivamente de la presencia de patógenos. A fin de poderla gestionar hay que integrar los distintos elementos que conforman el mantenimiento y gestión de los peces²: parámetros del agua, alimentación, sistemas de filtración, gestión de los stock e importaciones, monitoreo de patógenos (ver ejemplo en la Tabla 4), protocolos de trabajo y personal.

El estatus sanitario de una instalación se ha de describir en un informe estandarizado, o *health report*, y actualizado, donde se recogerán los resultados de las analíticas, los históricos, el tipo de estas (PCR e histología), información sobre la instalación (número de sistemas, tipo de filtraciones), un histórico de los parámetros del agua, las incidencias acaecidas y cómo se gestionan las

poblaciones (*bleaching* huevos, gestión poblaciones). Igualmente, y para consulta de dudas deberemos proporcionar el contacto del responsable del animalario.

Tabla 4.-Ejemplo de un programa de analíticas para monitorear el estado de salud de una población sanitaria de pez cebra.

	Histopatología	PCR	PCR biofilm	Mortalidad/ índices zootécnicos	Analítica agua
Frecuencia	Bianual	Bianual	Bianual	Continuo	Continuo
Número	85 peces	3 pools (3x10 peces)	1 muestra	Toda la colonia	
		Tanque rotífero		Colorna	
Procedencia	Centinelas	Colonia	Colector	Toda la colonia	Todos los
		Alimento			sistemas
Patologías	Todas	SPF (1r semestre) Todas (2° semestre)	Mycobacterium, P. tomentosa (también	Brotes	No infecciosa
		Mycobacterium sp.	flotación)	flotación)	
Importación		Ad hoc (adultos/heces)		Histórico	Health report

Sin duda el desarrollo de programas de monitorización conjuntamente al de stock SPF y de alta calidad genética permitirán aumentar la significancia y homogeneidad de los experimentos. Así mismo, el control y seguimiento de las patologías disminuirá la incidencia de estas mejorando considerablemente la productividad y bienestar de las poblaciones de pez cebra.

BIBLIOGRAFÍA

- 1. Borges A., Pereira N., Franco M., et al. Implementation of a zebrafish health program in a research facility: a four-year retrospective study. Zebrafish. 2016;13:S-115-26.
- 2. Murray K.N., Varga Z.M., and Kent M.L. *Biosecurity and health monitoring at the zebrafish international resource center.* Zebrafish. 2016;13:S-30-8.
- 3. Varga Z.M., Lawrence C., Ekker S.C., et al. Universal Healthcare for Zebrafish. Zebrafish.2016;13(1):S1-4.
- 4. Martins S., Monteiro J.F., Vito M., et al. Toward an integrated zebrafish health management program supporting cancer and neuroscience research. Zebrafish. 2016;13:S-47-55.
- 5. Watts S.A., Lawrence C., Powell V., et al. The vital relationship between nutrition and health in zebrafish. Zebrafish. 2016:13:S-72-6.

Control sanitario

- 6. Goodwin N., Karp N.A., Blackledge S., et al. Standardized welfare terms for the zebrafish community. Zebrafish. 2016;13:S-164-8.
- 7. Ramos Blasco J. *Gestión del bienestar en los peces de experimentación*. Derecho Animal (Forum of Animal Law Studies). 2019;vol. 10/4.
- 8. Aleström P., D'Angelo L., Midtlyng P., et al. Zebrafish: Housing and husbandry recommendations. Laboratory Animals. 2019.
- 9. Forsatkar M.N., Safari O., and Boiti C. *Effects of social isolation on growth, stress response, and immunity of zebrafish*. ActaEthologica. 2017.
- 10. Watts S.A., Lawrence C., Powell M., et al. The Vital Relationship between Nutrition and Health in Zebrafish. Zebrafish. 2016;(1):572-6.
- 11. Chang C.T., Colicino E.G., DiPaola E., et al. Evaluating the effectiveness of common disinfectants at preventing the propagation of Mycobacterium spp. isolated from zebrafish. Comparative Biochemistry and Physiology. 2015. Part C:Toxicology and Pharmacology.
- 12. Crim M.J. and Riley L.K. *Viral diseases in zebrafish: what is known and unknown.* ILAR journal. 2012;53(2):135-43.
- 13. Westerfield M. *The Zebrafish Book, 5th Edition; A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio).* 2007. Eugene, University of Oregon Press.
- 14. Collymore C., Crim M.J., and Lieggi C. Recommendations for Health Monitoring and Reporting for Zebrafish Research Facilities. Zebrafish. 2016;13(1):S138-48.
- 15. Kent M.L., Spitsbergen J.M., Matthews J.M., *et al. Diseases of Zebrafish in Research Facilities.* Zebrafish International Resource Center.
- Bermúdez R., Losada A.P., Azevedo A.M., et al. First description of a natural infection with spleen and kidney necrosis virus in zebrafish. J Fish Dis. 2018;41:1283-94.
- 17. Altan E., Kubiski S.V., Boros A., et al. A Highly Divergent Picornavirus Infecting the Gut Epithelia of Zebrafish (Danio rerio) in Research Institutions Worldwide. Zebrafish. 2019;16(3):291-9.
- 18. Rodriguez I., Novoa B., and Figueras A. *Immune response of zebrafish* (*Danio rerio*) against a newly isolated bacterial pathogen Aeromonas hydrophila. Fish & Shellfish Immunology. 2008;25(3):239-49.
- 19. Bullard S.A., McElwain A., and Arias C.R. Scanning electron microscopy of "saddleback" lesions associated with experimental infections of Flavobacterium rrcolumnare in channel catfish, Ictalurus punctatus (Siluriformes: Ictaluridae), and zebrafish, Danio rerio (Cypriniformes: Cyprinidae). JWorld Aquacult Soc. 2011;42:906-13.
- Petrie-Hanson L., Romano C.L., Mackey R.B., et al. Evaluation of zebrafish Danio rerio as a model for enteric septicemia of catfish (ESC). J. Aquat. Animal Health. 2007;19:151-8.
- 21. Whipps C.M., Dougan S.T., and Kent M.L. *Mycobacterium haemophilum infections of zebrafish (Danio rerio) in research facilities*. FEMS Microbiol Lett. 2007;270(1):21-6.

- 22. Whipps C., Lieggi C., and Wagner R. *Mycobacteriosis in Zebrafish Colonies*. ILAR Journal. 2012;53(2):95-105.
- 23. Gauthier, D.T and Rhodes, M.W. *Mycobacteriosis in fishes: A review. The Veterinary Journal.* 2009;180(1):33-47.
- 24. Dykstra, M., Astrofsky, K, Schrenzel, et al. High mortality in a large-scale zebrafish colony (Brachydanio rerio Hamilton & Buchanan, 1822) associated with Lecythophora mutabilis (Van Beyma) W. Gams & McGinnis. Comparative Medicine. 2001;51(4):361-8.
- 25. Ke X., Wang J., Gu Z., et al. Saprolegnia brachydanis, A New Oomycete Isolated from Zebra Fish. Mycopathologia. 2008;167:107-13.
- 26. Whipps C.M. and Kent M.L. *Polymerase chain reaction detection of Pseudoloma neurophilia, a common microsporidian of zebrafish (Danio rerio) reared in research laboratories.* J Am Assoc Lab Anim Sci. 2006;45(1):36-9.
- 27. Whipps C.M., Murray K.N., and Kent M.L. *Occurrence of a myxozoan parasite Myxidium streisingeri n. sp. in laboratory zebrafish Danio rerio.* J Parasitol. 2015;101(1):86-90.
- 28. Kent M.L., Bishop-Stewart J.K., Matthews J.L., et al. Pseudocapillaria tomentosa, a nematode pathogen, and associated neoplasms of zebrafish (Danio rerio) kept in research colonies. Comp Med. 2002;52(4):354-8.
- 29. Murray K.N. and Peterson T.S. *Pathology in practice. P tomentosa infection in zebrafish.* Journal of the American Veterinary Medical Association. 2015;246(2):201-3.
- 30. Mocho J.P. Three-Dimensional Screen: A Comprehensive Approach to the Health Monitoring of Zebrafish. Zebrafish. 2016;13(1):S132-7.
- 31.Crim M.J., Lawrence C., Livingston R.S., et al. Comparison of Antemortem and Environmental Samples for Zebrafish Health Monitoring and Quarantine. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2017;56(4):412-24.
- 32. Miller M., Sabrautzki S., Beyerlein A., et al. Combining fish and environmental PCR for diagnostics of diseased laboratory zebrafish in recirculating systems. PLoS ONE. 2019;14(9).

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.



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.

SAS Ventilado

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

Bioquell ProteQ

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

Bioquell BQ50

Generador móvil y robusto. Resultados automáticos, rápidos y probados.



Bioquell L-4

Generador de VPH móvil. Ideal para salas, aisladores, RABS, cabinas, etc.



Bioquell IG-2

Solución integrada con su equipo y proceso operativo.



Bioquell SeQure

Sistema fijo montado en pared.



Asilador Qube

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













MMM Group bmt@bmtiberia.es

www.bmtiberia.es

Esterilizadores de vapor adaptados a sus necesidades







Reproducción y genética

Factores que pueden afectar al éxito en la criopreservación de embriones de ratón

Tomás García Robles

Veterinario

Palabras clave: criopreservación, embrión, protocolo.

INTRODUCCIÓN

El auge de las líneas modificadas genéticamente en los ratones de laboratorio y el intercambio a nivel mundial de estas líneas ha llevado a que, cada vez, más centros dispongan de su propio servicio de criopreservación. Existen una gran variedad de protocolos de criopreservación, tanto para las células germinales como para los embriones.

En primer lugar, y para garantizar la correcta realización de la técnica, es importante comprobar si lo que se está congelando se está haciendo correctamente. Para ello, deberían realizarse test de viabilidad, de manera rutinaria *in vitro*, por ejemplo, testando 5 embriones con cada lote nuevo de crioprotectores. Igualmente, se debería realizar al menos un test *in vivo* para comprobar que la línea se puede recuperar y dar por buena una línea criopreservada.

A continuación, hablaremos de algunos de los factores que pueden influir en los resultados obtenidos en la criopreservación. Nos centraremos en el proceso de criopreservación y en todas las técnicas asociadas a dicho proceso, como la transferencia de embriones, los animales usados y, por supuesto, el factor humano.

La criopreservación de células vivas y en nuestro caso de embriones consiste en la disminución de la temperatura hasta los -196 °C en nitrógeno líquido. Con ello, se reducen las funciones vitales de las células hasta detenerlas y así poderlas mantener indefinidamente. Los únicos fenómenos que podrían alterarlas en estas condiciones son la formación de radicales libres y la rotura de macromoléculas por radiaciones ionizantes o rayos cósmicos¹.

Durante la congelación, se originan cristales de hielo intracelular y extracelularmente que pueden dañar las

células. Para evitar este daño, existen distintos protocolos de congelación en los que se usan distintos crioprotectores a concentraciones, temperaturas y tiempos de actuación determinados.

Dentro de los crioprotectores encontramos los denominados penetrantes de bajo peso molecular –dimetilsulfoxido (DMSO), etilenglicol, propilenglicol, etc.–, que sustituyen el agua del embrión para evitar la formación de cristales de hielo intracelular; y los protectores de membrana, azucares de alto peso molecular y que por esto no pueden entrar en el interior, como la sacarosa que deshidrata el embrión por la diferencia de presión osmótica. La sacarosa es la más usada en las soluciones de descongelación.

Al introducir el embrión en los crioprotectores, éste se somete a un estrés osmótico, deshidratándolo durante la congelación y rehidratándolo durante la descongelación. Si estos cambios de volumen son muy grandes se puede dañar el citoesqueleto haciendo inviable el embrión.

Por otro lado, la toxicidad de los crioprotectores penetrantes puede producir alteraciones en el embrión. Existen crioprotectores comerciales, pero por lo general, se elaboran en los propios laboratorios. Por este motivo, es muy importante usar reactivos de alta calidad y testados para el uso embrionario, tener las balanzas e instrumentos volumétricos bien calibrados, y también es recomendable testar *in vitro* todos los lotes de los medios elaborados.

Por último, durante la criopreservación, todos los embriones pasarán dos veces por la zona de letalidad, entre los -15° C y -60° C, al congelarlos y al descongelarlos².

Todos estos factores pueden ocasionar en el embrión una serie de daños tanto físicos como bioquímicos: rotura de membranas, alteraciones cromosómicas como pérdida o ganancia, poliespermia, falta de extrusión del cuerpo polar, alteraciones en el DNA que producen apoptosis, alteraciones en el citoesqueleto como la disolución de los microtúbulos, alteraciones en las proteínas y enzimas debido a la deshidratación y pérdida de sus funciones, y alteraciones en la ultraestructura como en los gránulos corticales y en la zona pelúcida, así como endurecimiento y fractura de la misma³. Estos daños no se pueden observar de manera directa con el microscopio sin el uso de técnicas como la tinción vital.

PROBLEMAS DURANTE LA CRIOPRESERVACIÓN

A continuación, hablaremos de algunos problemas que podemos observar durante la criopreservación y que podemos relacionar, directamente, con los daños anteriormente citados.

Durante la vitrificación, la concentración de los crioprotectores penetrantes, los tiempos y las temperaturas en las que se mantiene al embrión en la solución de congelación son críticos. Si se modifican estos parámetros, pueden aparecer daños observables bajo el microscopio durante el cultivo de los embriones tras la descongelación.

Tener la muestra menos tiempo en el crioprotector impide la correcta difusión del crioprotector penetrante, pudiendo aparecer una lesión por formación de hielo intracelular. Una vez en la solución de descongelación, se verán los embriones normales, pero cuando se introduzcan en el medio de cultivo se observarán los blastómeros hinchados y tras una hora se verán contraídos⁴.

En el caso contrario, si se mantiene la muestra más tiempo en el crioprotector y/o a una temperatura superior a la indicada en el protocolo, se pueden producir lesiones por toxicidad de los crioprotectores penetrantes. Se observarán al principio con una apariencia normal, pero tras una hora se podrá ver descompactación de los blastómeros y al día siguiente observaremos los embriones degenerados⁴.

Si durante la descongelación mantenemos el embrión en la solución de descongelación a una temperatura muy baja, el crioprotector penetrante saldrá de la célula más lentamente de lo que entre el agua, generándose, por tanto, una lesión por hinchazón osmótica. Una vez en el medio de cultivo, se

observarán los embriones con una apariencia normal, pero tras una hora, algunos se habrán contraído y estos no se desarrollarán tras 24 horas que será cuando mejor se observe esta lesión⁴. En este caso, tendremos un descenso importante de la viabilidad.

Si al preparar la solución de descongelación no pesamos bien la sacarosa y tenemos un medio hipotónico en relación con el crioprotector, entonces se puede producir una lesión por contracción osmótica caracterizada por una hinchazón de los embriones al introducirlos en el medio de cultivo⁴.

Tanto la hinchazón como la contracción osmótica están relacionadas con la concentración de los crioprotectores que se usan. Es por este motivo que, cuando se prepara la solución de congelación o la de descongelación en el laboratorio, hay que ceñirse estrictamente a lo que nos indique el protocolo.

Si todo ha ido bien, al descongelar los embriones en la solución de descongelación, veremos los blastómeros encogidos dentro de la zona pelúcida. Después, al ponerlos en el medio de cultivo recuperarán su volumen normal, y a las 24 h de cultivo, se podrá observar en estadio de blastocisto y alguno ya eclosionado.

OTROS FACTORES QUE PUEDEN INFLUIR EN EL ÉXITO DE LA CRIOPRESERVACIÓN

El éxito de la criopreservación depende también de otros factores entre los que debemos considerar el proceso de cultivo y manejo de los embriones; la gran variabilidad de fondos genéticos de las distintas líneas de ratones modificados genéticamente; el genotipo de los animales usados; la transferencia de los embriones; y, por último, el factor humano.

Cultivo y manejo de los embriones

El cultivo y el manejo de los embriones también pueden afectar a la viabilidad de estos. Aunque en la actualidad existen medios de cultivo optimizados como el KSOM-AA, el hecho de que los embriones estén fuera de su medio natural los hace menos competentes para su implantación y desarrollo⁵. Estos medios no reproducen al 100% las condiciones fisiológicas naturales del desarrollo embrionario. Es muy importante atemperar y equilibrar los medios antes de su uso. En los protocolos de vitrificación en los que las concentraciones de los crioprotectores son críticas, el manejo de los embriones al introducirlos en los medios y el tamaño de las pipetas en las que se haga, también puede afectar. Otro factor muy importante en el

Reproducción y genética

cultivo de los embriones es el incubador de CO₂, por lo que es necesario hacer una validación anual de los mismos.

Fondo genético en el que realizamos la criopreservación

La gran variabilidad de fondos genéticos de las distintas líneas de ratones modificados genéticamente y la pérdida de información durante el mantenimiento de las líneas puede tener una gran implicación, ya que el fondo genético puede influir en el éxito de la criopreservación⁶. Por ejemplo, el fondo BALB/c tiene peores resultados de viabilidad tras la criopreservación que otros fondos como el C57BI/6⁶.

Genotipo

El genotipo de los animales usados también puede influir en la viabilidad de estos embriones⁷. En muchas ocasiones se desconocen las consecuencias que puede tener una modificación genética en el desarrollo de los embriones. Por ejemplo, existen genes letales en homocigosis que pueden afectar al desarrollo embrionario o fetal. Esto puede implicar que un embrión se desarrolle in vitro, pero nunca llegue a nacer.

Es muy importante conocer el genotipo en el que se quiere congelar la línea y por lo tanto los genotipos parentales de los embriones que vamos a congelar e identificar cada muestra correctamente. No será lo mismo congelar embriones en un cruce Homocigoto (HO)xHO, en los que yo recomendaría unos 150-200 embriones para asegurar la línea, que un cruce Heterocigoto (HE)xHE o HOxWild type, etc., en el que recomendaría congelar el doble. Lo ideal es tener suficientes embriones para revivir al menos 3 veces la línea.

Transferencia embrionaria

En mi opinión, éste es uno de los puntos más críticos a la hora de realizar cualquier técnica de reproducción asistida y por ende de la criopreservación. Indistintamente de donde se transfiera, en infundíbulo o útero, y del estadio en el que se transfiera, se han de tener ciertas consideraciones a la hora de realizar la transferencia.

Lo primero para tener en cuenta es el número de embriones que se van a transferir. Un número demasiado bajo, de entre 3 a 5 embriones, puede no darnos buenos resultados ya que, aunque la hembra para, puede darse canibalismo como estrategia evolutiva de la especie. Por otro lado, transferir más de 18 embriones no aumentará la proporción de animales nacidos 6,8 por lo que estaremos malgastando embriones.

Otro punto para tener en cuenta es si la transferencia se hace unilateral o bilateralmente. La división anatómica entre los dos cuernos uterinos en las ratonas hace pensar que no se produce una migración de los embriones transferidos al otro cuerno uterino⁹. Por otro lado, y en consonancia con una de las 3Rs — el refinamiento—, la cirugía unilateral es menos dolorosa, ya que se realiza una sola incisión, e igualmente efectiva en la gran mayoría de las transferencias, aunque se obtiene una menor descendencia¹⁰. Mi recomendación será siempre hacerla bilateral, no sólo por el hecho de que no existe migración entre los cuernos, sino porque existen siempre más posibilidades de éxito al tener dos oportunidades para transferir los embriones.

Factor humano

Todos podemos cometer fallos. Un componente muy importante es el emocional. Cómo estamos el día que vayamos a realizar las distintas técnicas, si el laboratorio dónde vamos a trabajar está tranquilo y no va a haber interrupciones, etc. Este factor, aunque muchas veces no se tiene en cuenta, es determinante en el éxito de todo el proceso de criopreservación.

CONCLUSIÓN

En conclusión, a la hora de realizar un protocolo de criopreservación, ya sea para las pruebas de viabilidad o para recuperar una línea criopreservada, siempre se tienen que tener en cuenta:

- Fondo genético en el que se va a realizar.
- Genotipo de los Ratones Modificados Genéticamente que se van a usar para la criopreservación y tipo de cruce que se realizará para la obtención de los embriones.
- Protocolo que empleemos para la criopreservación. Es fundamental seguir estrictamente el protocolo y ser muy riguroso con los tiempos que se indiquen, para así evitar daños embrionarios debido a la toxicidad de los crioprotectores, el estrés osmótico, daños en la zona pelúcida, etc.
- A la hora de cultivar los embriones, usar siempre los medios atemperados y equilibrados si es necesario. Nunca usar medios en los que se observe precipitado o formación de cristales.

Reproducción y genética

Primavera 2020. Número 85

- Aparataje/material, es recomendable que se haga una revisión anual del incubador de CO₂ para un correcto calibrado. De la misma forma, todos los aparatos que se usen han de estar verificados y en correcto uso el día que se realicen estas técnicas. Duplicar todo el material que nos sea posible. Es importante trabajar siempre que podamos de la manera más aséptica y con el material desinfectado y/o esterilizado.
- A la hora de transferir los embriones descongelados se recomienda transferir entre 6 y 18 embriones por hembra para optimizar los embriones disponibles. Y, en mi opinión, hacer dichas transferencias bilateralmente para, de este modo, tener dos oportunidades por hembra cuando tengamos más de 10 o 12 embriones.
- Tener en cuenta el factor humano. Fijar un día de la semana para cada uno de los procesos, que los medios/crioprotectores siempre los realice la misma persona, intentar no realizar estas técnicas en los días "malos"... son ejemplos para reducir en la medida de lo posible el error humano.

BIBLIOGRAFÍA

- Bakhach J. The cryopreservation of composite tissues: principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. Organogenesis. 2009;5(3):119-26.
- 2. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. J Physiol Cell Physiol. 1984;247(3):C125-42.
- 3. Shaw J.M., Oranratnachai A., and Trounson A.O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. Theriogenology. 2000;53(1):59-72.
- Kasai M., Ito K., and Edashige K. Morphological appearance of the cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of cryoinjury. Hum Reprod. 2002;17(7):1863-74.
- Absalón-Medina V.A., Butler W.R., and Gilbert R.O. Preimplantation embryo metabolism and culture systems: experience from domestic animals and clinical implications. J Assist Reprod Genet. 2014;31(4):393-409.
- 6. Dorsch M., Wittur I., and Garrels W. Success of embryo transfer in mice with freshly collected and cryopreserved two-cell embryos with different genetic backgrounds correlated with the number of transferred embryos: A 5-year retrospective analysis. Lab Anim. 2019;53(6):577-86.

- Schmidt P.M., Hansen C.T., and Wildt D.E. Viability of Frozen-Thawed Mouse Embryos is Affected by Genotype. Biol Reprod. 1985;32(3):507-14
- 8. González-Jara P., Fontela T., López-Mimbela E., et al. Optimization of the balance between effort and yield in unilateral surgical transfer of mouse embryos. Lab Anim. 2017;51(6):622-8.
- 9. Rülicke T., Haenggli A., Rappold K., et al. No transuterine migration of fertilised ova after unilateral embryo transfer in mice. Reprod Fertil Dev. 2006;18(8):885-91.
- Mahabir E., Volland R., Landsberger A., et al. Reproductive performance after unilateral or bilateral oviduct transfer of 2-cell embryos in mice. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2018;57(2):110-4.



Refinamiento de la técnica optogenética

Garikoitz Azkona Mendoza

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

Palabras clave: refinamiento, optogenética, luz.

La optogenética es una técnica que combina la luz y la ingeniería genética para controlar la actividad de las células del cerebro. La técnica, que fue descrita por primera vez en el 2005¹, es muy popular actualmente en aquellos laboratorios que estudian la función cerebral, ya que permite controlar, sin necesidad de electrodos, la actividad neuronal.

La técnica se basa en la introducción, en las neuronas, de genes exógenos que codifican proteínas fotosensibles (opsinas) provenientes de algas o bacterias. De esta forma, las neuronas se vuelven sensibles a la luz. Para ello, se inyectan en el área del cerebro de interés vectores virales que contienen los genes que posteriormente se traducirán en las proteínas fotosensibles. Una vez que el animal expresa las proteínas en los tipos neuronales que deseamos, se implanta mediante cirugía un cable de fibra óptica para que pueda llegar la luz a la región que queremos estudiar¹. De esta forma, las proteínas actuarán como interruptores, activando o desactivado las neuronas en función de la luz aplicada mediante el cable de fibra óptica (ver Figura 1). Esta activación/inhibición se lleva a cabo abriendo/cerrando los canales dependientes de Ca²+.



Figura 1.- Una rata con un implante de luz para la estimulación optogenética de las neuronas – EFE.

La optogenética se ha utilizado para estudiar el cerebro desde muchos puntos de vista diferentes, desde estudios para determinar la comunicación de un grupo de neuronas individuales hasta la interacción entre grandes regiones del cerebro². Muchos otros estudios han utilizado este método para investigar temas como el miedo condicionado, la toma de decisiones y recompensa, el almacenamiento de recuerdos³ o los cambios cerebrales tras un derrame cerebral⁴.

Este año, un grupo de investigación del Centro de Cognición y Socialidad del Instituto de Ciencias Básicas de Corea del Sur liderado por el Profesor Won Do Heo ha diseñado y mejorado una herramienta para controlar la actividad neuronal del cerebro mediante luz azul⁵. La técnica, publicada en el mes de enero de este año en *Nature Communications*, utiliza unos constructos optogenéticos denominados monster-OptoSTIM1 (monSTIM1). Este constructo está formado por dos partes: CRY2, que es sensible a la luz azul, y STIM1, que activa los canales de calcio. Al constructo se le ha añadido GFP para que los investigadores sepan mediante la luz verde que emite donde se han expresado (ver Figura 2). Las neuronas que expresen monSTIM1 bajo luz azul abrirán sus canales iónicos dependientes de calcio, por lo que el Ca²+ entrará dentro de la misma produciendo la despolarización de esta (activación).

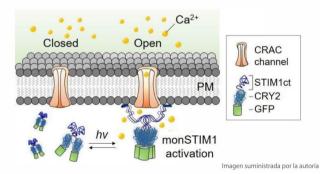


Figura 2.- Esquema del mecanismo de activación de monSTIM1. Crédito: Instituto de Ciencias Básicas de Corea del Sur. Fuente: *Nature Communications*.

Bienestar animal

Además del constructo, la novedad radica en la forma de su activación. La herramienta ha sido mejorada para que la herramienta optogenética funcione gracias a una fuente externa de luz azul colocada en el techo de la jaula del animal (ver Figura 3).

En comparación con las técnicas optogenéticas desarrolladas previamente, los investigadores mejoraban la sensibilidad a la luz de la parte CRY2 aproximadamente 55 veces, evitando el aumento de Ca²⁺ basal. Además, el constructo monSTIM1 se inyectó en diferentes áreas cerebrales de ratones mediante vectores virales, y demostraron la activación de los canales en la corteza cerebral, así como en regiones más profundas como el hipocampo y el tálamo.

A nivel conductual se observaron cambios en los ratones que expresaban monSTIM1 en neuronas excitadoras de la corteza cingulada anterior, región cerebral implicada en la motivación empática. Tras la activación de monSTIM1 por la luz azul (30 min), los ratones observaban (observador) como se les administraban descargas eléctricas (1 mA, cada 10s, 4 min) a otro ratón (demostrador), al que no se le había activado monSTIM1. De esta forma se evocaba la conducta de congelamiento vicaria. Durante los 4 minutos de entrenamiento los observadores, con los canales de calcio activados, mostraron niveles mayores de conducta de congelamiento que los demostradores. Pasadas 24 horas, los ratones observadores se colocaban en la misma jaula donde habían estado observando cómo se le aplicaban las descargas al ratón demostrador y se media el tiempo de conducta de congelación. Los datos indican que los ratones con monSTIM1 activado presentaban durante más tiempo la conducta de congelación, lo que indica que la señalización de Ca²⁺ contribuyó a las respuestas de miedo tanto a corto como a largo plazo.

Esta técnica se puede aplicar a una amplia gama de investigaciones sobre la señalización del calcio cerebral, ya que permite una fácil manipulación de la señal intracelular del calcio sin dañar el cerebro. Además, evita una segunda cirugía y la inflamación, los cambios morfológicos de las neuronas y la desconexión de circuitos neuronales provocados por la implantación del cable, por lo que es un buen refinamiento que mejorará el bienestar de los animales utilizados en estos experimentos.



Figura 3.- Luz azul en la cubeta donde se aloja el ratón. Crédito: Instituto de Ciencias Básicas de Corea del Sur. Fuente: *Nature Communications*

BIBLIOGRAFÍA

- Boyden E.S., Zhang F., Bamberg E., et al. Millisecond-timescale genetically targeted optical control of neural activity. Nat. Neurosci. 2005:8:1263-8.
- 2. Lim D.H., LeDue J., Mohajerani M.H., et al. Optogenetic approaches for functional mouse brain mapping. Front. Neurosci. 2013;7:54.
- 3. Deisseroth K. *Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience.* Nat. Neuroscience. 2015;18(9):1213-25.
- 4. Lim D.H., LeDue J., Mohajerani M.H., et al. Optogenetic mapping after stroke reveals network-wide scaling of functional connection and heterogeneous recovery of the péri-infart. J. Neurosci. 2014;34(49):16455-66.
- 5. Kim S., Kyung T., Chung J.H., et al. Non-invasive optical control of endogenous Ca2+ channels in awake mice. Nature Communications. 2020;11:20.

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 of the second matachana | +50 | YEARS

CEEA-OH EA-OHCEEA

Una cuestión de sexo y género

Victoria Fornés Ferrer

Oficina de Investigación Responsable, Universidad Miguel Hernández

Palabras clave: sexo, género, hembra.

INTRODUCCIÓN

Entre los años 1997 y 2000, la FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) retiró 10 fármacos del mercado estadounidense, siendo 8 de ellos por motivos de seguridad ya que eran más peligrosos para las mujeres. Actualmente, desarrollar un fármaco cuesta 5.000 millones de euros, de modo que debemos minimizar el riesgo de fracaso. Sabiendo que muchos de los problemas se arrastran desde la investigación preclínica, debemos replantear y cuestionar las asunciones sobre lo que creemos conocer: ¿el sexo importa?

Para asegurar la generalización de la investigación preclínica, el sexo debe ser una consideración fundamental en la planificación, análisis e interpretación de los descubrimientos científicos. Si no logramos que los hallazgos sean extrapolables a toda la población –por no hacer bien nuestro trabajo–, la investigación es un fracaso que provoca un inmoral e inaceptable despilfarro de tiempo y recursos.

La realidad es que, en el último siglo, la investigación preclínica se ha centrado en el modelo animal macho. Mayoritariamente no se han incluido hembras en los experimentos científicos alegando la variabilidad natural del sexo femenino causado por las fluctuaciones hormonales debidas al ciclo reproductivo; a pesar de la falta de pruebas que respalden esta posición. Por tanto, la confianza histórica en el modelo animal macho ha generado datos imprecisos e incompletos que provocan una falta de generalización y extrapolación a la práctica clínica.

IMPACTO DEL SESGO SEXUAL EN INVESTIGACIÓN PRECLÍNICA

Hombres y mujeres no somos iguales

Sexo y género

El **sexo** es una variable biológica definida por las características

codificadas en el ADN, que determinan diferencias a nivel genético, molecular, celular y fisiológico.

El **género** se refiere a los factores sociales, culturales y psicológicos que perfilan las actitudes, comportamientos y estereotipos.

La realidad es que muchas de las enfermedades humanas afectan de manera, sustancialmente, distinta a hombres y mujeres, donde la influencia del sexo puede afectar a la susceptibilidad de la enfermedad, la manifestación y progresión de los síntomas, la respuesta a los tratamientos y la presentación de efectos adversos. Respecto a la aparición de ciertas patologías, existen diferencias bien documentadas en las que las mujeres presentan una mayor incidencia frente al hombre en enfermedades cardiovasculares, autoinmunes, dolor crónico y trastornos neuropsiquiátricos¹. Un ejemplo, sería la esclerosis múltiple (MS), en la que las mujeres son más susceptibles a sufrir esta enfermedad (mayor incidencia), aunque desarrollan formas menos severas de esta². En otro caso, en pacientes con melanoma o cáncer de pulmón, la inmunoterapia ha proporcionado un mejor entendimiento de porqué los pacientes responden diferente en base a su sexo, siendo mayor la proporción de hombres que alcanzan la remisión completa en comparación con las mujeres³. Asimismo, se ha observado que dosis bajas de aspirina provocan efectos preventivos distintos en hombres que en mujeres²; mientras que al sexo masculino se le administra para reducir problemas de corazón, al sexo femenino se le receta para reducir la incidencia de ictus. Hace unos años, la FDA detectó que las mujeres que tomaban un fármaco para tratar el insomnio (zolpidem®) presentaban un mayor porcentaje de efectos adversos que los hombres; concluyendo que éstas debían tomar la mitad de la dosis recomendada. Exactamente, lo mismo sucedió con la desmopresina, un fármaco recetado para controlar la nicturia³; este fármaco activa los receptores de vasopresina cuya expresión depende del cromosoma X, lo que hace a las mujeres más sensibles a los efectos antidiuréticos de la vasopresina que a los hombres (con un solo cromosoma X).

CEEA-OH

A parte de las diferencias en las enfermedades entre ambos sexos, también se observa, comúnmente, una influencia del sexo en estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos¹. Todo esto se debe a una falta de traslación de la investigación preclínica a la clínica como consecuencia de los sesgos introducidos en el diseño experimental y los sesgos de publicación al excluir las hembras de los experimentos.

Exclusión de las hembras

En un artículo, en el que se estudió la evolución histórica de la distribución de los sexos de los estudios en animales en *The Journal of Pharmacology* y en *The Journal of Physiology*, se concluyó que en la primera mitad del siglo XX el 70% de los estudios no especificaba el sexo del animal. A partir de 1950, este comportamiento mostró una tendencia negativa, estableciéndose cerca del 20% a principios del siglo XXI. Destaca como a partir de 1950, el porcentaje de estudios que declaran utilizar solamente machos comienza a aumentar hasta alcanzar el 60% en 2010⁴. Como se ha dicho, esta exclusión del sexo femenino se debe a la atribución de una mayor variabilidad a causa de su ciclo reproductivo. No obstante, un metaanálisis de 293 publicaciones reveló que la variabilidad en ratones hembra no era mayor que la de los machos^{5,6,7}.

La convención es otra razón de exceso de confianza en la elección del modelo animal masculino; probablemente, y de manera errónea, con el objetivo de tener una muestra estandarizada y homogénea. De esta manera, los investigadores creen conseguir mayor reproducibilidad (cuando los resultados difieren entre sexos), y generar la mitad de los costes de reproducción y mantenimiento. No obstante, precisamente, el hecho de que existan diferencias entre los sexos es una clara señal de que los resultados no serán reproducibles en humanos, ni trasladables a la práctica clínica. La solución es evidente, mejorar la reproducibilidad a través de la heterogeneidad: incluir ambos sexos.

No se trata de la salud de la mujer, se trata de buena ciencia

Así pues, ante el planteamiento de cualquier hipótesis de toda investigación en un modelo animal concreto, deberemos investigar la potencial influencia del sexo como variable biológica, considerando esta variable en el diseño, en el análisis, y en la comunicación y representación de los datos. La Figura 1 revela la importancia de presentar los datos y realizar los análisis de manera disgregada por sexo. En la práctica común, la respuesta de machos y

hembras se muestra de manera agrupada (ver Figura 1.A), lo que puede provocar un enmascaramiento de las diferencias entre sexos. Ignorar el sexo en el análisis puede llevar a falsas interpretaciones de los resultados (ver Figura 1.C-E). La Figura 1.B sería la única situación, en la que habiendo comprobado que la consideración del sexo no modifica la interpretación de los resultados, podríamos representar de manera agrupada ambos sexos. Sin embargo, cuando se den las circunstancias de las Figuras 1.C-E, prescindir de la información que aporta el sexo ocasionará un enmascaramiento de información biológicamente importante, como puede ser la interacción de las variables Tratamiento y Sexo. Existirá una interacción entre la variable sexo y la intervención cuando la variable tratamiento no funcione igual de bien en machos que en hembras; es decir, cuando el efecto del sexo tiene alguna influencia en la manera en que la intervención actúa sobre la respuesta. El diseño experimental, por tanto, debería evaluar tanto la comparación directa entre machos y hembras, como la interacción entre el sexo y el tratamiento.

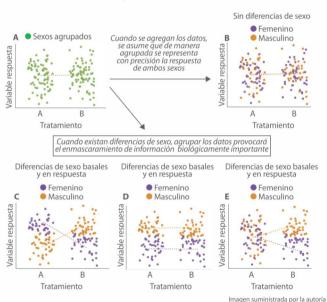


Figura 1.-Efectos de agregar los datos por sexo y los efectos de la interacción entre las variables sexo y tratamiento. Gráficos obtenidos a través de datos simulados mediante el software estadístico R.

Desafortunadamente, existe un aparente inconveniente en el hecho de incluir ambos sexos en el estudio, y es que se necesita duplicar el número de animales por experimento; aunque, esto no es completamente cierto. Existen diseños experimentales eficientes que permiten la incorporación de ambos sexos, como

CEEA-OH

son los diseños factoriales. La estrategia de los diseños factoriales permite recoger y testear muestras a través de la combinación de dos factores experimentales con múltiples niveles (en este caso dos, intervención y sexo). Este diseño permite evaluar el efecto de cada factor y la interacción entre los niveles de ambas variables. Para estos casos, los tamaños muestrales pueden necesitar verse incrementados en un 14-33% para poder estimar el parámetro extra, pero desde luego no necesita duplicarse^{8,9}; incluso dependiendo del escenario, podría no verse ni incrementado el tamaño muestral.

Estos diseños permitirían, por lo tanto: analizar los datos por sexo para aumentar la probabilidad de detectar efectos significativos (corrigiendo por un posible factor confusión), mejorar la reproducibilidad del experimento y reducir el número de animales requeridos en los experimentos de forma acumulada. Y, todo esto, a un coste muy bajo.

DISCUSIÓN

Dada la importancia biológica de la variable sexo en el estudio de animales, células y humanos, el año 2013 el *National Institutes of Health* (NIH) comenzó a requerir a los investigadores que las mujeres fuesen incluidas en los ensayos clínicos de evaluación de nuevos fármacos. Aunque no fue hasta junio de 2015, cuando el NIH anunció un cambio en los criterios de evaluación de los revisores sobre las solicitudes de financiación. Esta modificación de la política requiere que se tenga en consideración el sexo femenino en los proyectos de investigación tanto básica como traslacional, y en caso de que se excluyan, deben justificarse de manera muy rigurosa los motivos. En resumen, o se incluyen hembras y mujeres, o no se consigue la financiación.

Para fomentar el mayor nivel posible de precisión y comprensión de la ciencia, el NIH ha promovido la iniciativa *Sex as a Biological Variable* (SABV): una política para mejorar la reproducibilidad a través de la transparencia y el rigor mediante la inclusión del factor sexo en el diseño, el análisis y la comunicación de los resultados de la experimentación animal y humana. Además, ha desarrollado la guía *Sex and Gender Equity in Research* (SAGER) para asistir a los propios investigadores y a los editores de las revistas en el informe del sexo y el género en las publicaciones. Incluso las directrices ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*), desarrolladas para mejorar los estándares del informe de los resultados de la experimentación animal, incluyen un apartado en el que especifican que se deben proporcionar detalles del sexo y cepa del animal utilizado.

Aun así, existe algún punto de vista que difiere y critica la inclusión del sexo femenino en investigación preclínica y clínica¹⁰. Sugieren que duplicar el tamaño muestral del estudio para poder comparar las diferencias entre sexos no es práctico ni asequible ni prudente; y que, éticamente, no está justificado. Refieren que el hecho de que no exista mayor variabilidad en las hembras que en los machos^{5,6,7} apunta precisamente a que no está justificada la necesidad de estudiar ambos sexos. Por tanto, tener que duplicar el número de animales en el experimento, duplicaría los costes de cría y mantenimiento de los investigadores. Esta crítica revela la falta de información y formación de lo que podría ser un pequeño sector de los profesionales de la investigación. Dichas afirmaciones realizadas confunden igualdad de variabilidad con igualdad de efecto. Que la variabilidad no sea mayor en un sexo que en otro sirve para rebatir la equivocada idea de que las hembras debían ser excluidas por su mayor variabilidad, pero no tiene, absolutamente, nada que ver con que las intervenciones funcionen igual o no en machos que en hembras. Y, precisamente, como no somos suficientemente conocedores de esta interacción, debemos evaluarlo para progresar en lo que denominamos medicina de precisión. Por último, atribuir la inclusión de hembras en los estudios a una duplicación del tamaño muestral y del coste, también denota una falta de renovación de conocimientos en cuanto al diseño experimental se refiere.

CONCLUSIÓN

En conclusión, las nuevas políticas que están promoviendo las instituciones pasan por considerar el sexo y el género en todas las fases de un proceso de investigación; desde el diseño experimental, la recolección de datos, el análisis de estos y el informe de los resultados. Aunque la consideración del sexo no influya en el proceso biológico en estudio, tenemos la obligación de reportar estas evidencias a la literatura porque es posible que nunca se haya estudiado. Informar de si existen o no existen diferencias entre ambos sexos hará posible conocer bajo qué circunstancias ocurre una efecto positivo o nulo.

Por último, en honor a la R de Reducción que promueve la inclusión de métodos que permitan que la información obtenida de los animales utilizados en experimentación sea maximizada con el objetivo de reducir el uso de animales adicionales; cabría señalar:

1) la inclusión de hembras en los estudios conlleva que las crías de este sexo nacidas se empleen en experimentación en vez de ser

CEEA-OH

eutanasiadas; 2) la consideración del sexo femenino en la planificación del estudio es propia de ciencia rigurosa, y por tanto exitosa, de modo que no resulta en un uso infructífero; y 3) la combinación de machos y hembras en diseños factoriales resulta en una disminución directa del uso de animales sin menoscabo de la maximización de la información. No se trata de incluir a las hembras para combatir el sexismo, sino porque es lo que se debe hacer, porque así es como se hace buena ciencia.

BIBLIOGRAFÍA

- Bespalov A., Michel M.C., and Steckler T. (Eds.). 2019. Good Research Practice in Non-Clinical Pharmacology and Biomedicine. Handbook of Experimental Pharmacology.
- 2. Clayton J.A. and Collins F.S. *Policy: NIH to balance sex in cell and animal studies.* Nature. 2014; 509(7500):282-3.
- 3. Tannenbaum C., Ellis R.P., Eyssel F., et al. Sex and gender analysis improves science and engineering. Nature. 2019;575(7781):137-46.
- 4. Beery A.K. and Zucker I. Sex bias in neuroscience and biomedical research. Neuroscience and biobehavioral reviews. 2011;35(3):565-72.
- 5. Becker J.B., Prendergast B.J., and Liang J.W. Female rats are not more variable than male rats: a meta-analysis of neuroscience studies. Biology of sex differences. 2016;7:34.
- 6. Prendergast B.J., Onishi K.G., and Zucker I. Female Mice Liberated for Inclusion in Neuroscience and Biomedical Research. Neuroscience and biobehavioral reviews. 2014;40:1-5.
- 7. Mogil J.S. and Chanda M.L. *The case for the inclusion of female subjects in basic science studies of pain*. Pain. 2005;117(1-2):1-5.
- 8. Miller L.R., Marks C., Becker J.B., et al. Considering sex as a biological variable in preclinical research. The FASEB Journal. 2017;31(1):29-34.
- 9. Buch T., Moos K., Ferreira F.M., et al. Benefits of a factorial design focusing on inclusion of female and male animals in one experiment. Journal of Molecular Medicine. 2019;97(6):871-7.
- 10.Fields R.D. *NIH policy: mandate goes too far.* Nature. 2014;510(7505):340.



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





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

Vestuario de protección y protección respiratoria: recomendaciones de protección frente a agentes infecciosos

Pablo Ramos Pérez

Director Comercial & Marketing en RamosSTS S.L.

Palabras clave: EPI, COVID19, mascarillas.

PRÓLOGO

Seguramente, y así lo deseamos todos, cuando este artículo llegue a vuestras manos habremos vivido unos de los episodios más intensos de la reciente historia española y podría decir mundial. Hoy 11 de marzo de 2020, día en el que escribo este prólogo, la OMS ha declarado la pandemia sobre COVID-19, la enfermedad causada por SARS-CoV-2, un agente infeccioso viral desconocido hasta ahora para el ser humano y que habrá causado un impacto económico y sobre las personas que no olvidaremos en mucho tiempo.

Desde principio de año todas las personas teníamos la esperanza de que el brote epidémico se circunscribiera al país de origen y alrededores como había ocurrido con la gripe aviar, SARS, Ébola y otras. Pero no ha sido así, ahora el mal llamado Primer Mundo está a merced de un patógeno cuya transmisibilidad ha desbordado todas las previsiones. Es un virus bastante listo, no mata rápidamente al hospedador y esto le permite replicarse una y otra vez entre individuos y sobrevivir fuera del hospedador muchos días (como su pretendido hermano mayor SARS). Además, es aerotransportado hasta unos cuatro metros —o al menos así se está diciendo— lo que facilita enormemente su diseminación. Hasta en las heces de los que superan la enfermedad se encuentra una importante carga viral durante varios días.

Todas estas consideraciones convierten a las barreras primarias de contención en una pieza clave en la protección de las personas. Hemos leído, visto y escuchado muchas cosas sobre los equipos de protección individual (EPI) en los medios; muchas erróneas, algunas casi ciertas y muy pocas correctas. Y dentro de los EPI, el público en general se ha centrado en las máscaras de protección respiratoria, a las que han supuesto un papel súper-protector en cuanto consigues una y te la pones. No es el momento de discutir ahora esto, pero sí de explicar de nuevo cuáles son sus capacidades, qué tipos existen y cómo se clasifican de la mano de un experto: Pablo Ramos Pérez.

Quizá cuando leáis este artículo hayan cambiado muchas cosas en España, conozcamos otras que ahora desconocemos sobre COVID-19 y, sobre todo, nos habremos dado cuenta que nunca estuvimos preparados, que se necesita mucha formación en Bioseguridad, cambiar muchas cosas en hospitales y Universidades para que existan muchas más personas con la información necesaria que tomen decisiones rápidas y acertadas – léase Oficiales de Riesgo Biológico—, y que pese a todo lo que pensamos, seguimos siendo muy débiles frente a la fuerza de lo más pequeño.

¡Mucha suerte a todos!

Fco. Javier García Palomo

Presidente de la Asociación Española de Bioseguridad (AEBioS)



Figura 1.- Trabajadores durante un simulacro de actuación en la planta 22 del Gómez Ulla. Sergio Enríquez-Nistal (El Mundo).

En sectores como la agricultura, la industria alimentaria, servicios sanitarios, médicos, gestión y reciclaje de residuos, empresas de gestión de pozos y alcantarillado, servicios de emergencia e intervención policía, militar, centros de investigación, ganadería, etc.; si los trabajadores entran en contacto con agentes biológicos, es esencial que cuenten con Equipos de Protección Personal e Individual (EPI) seguros y fiables para evitar la contaminación dual (desde y hacia el producto) y la infección o la propagación de agentes patológicos (ver Figura 1).

Pero ¿qué son los agentes biológicos? Puede obtenerse una definición completa en la Directiva 2000/54/CE de la Unión Europea "Sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo". Principalmente, el término "agente biológico" se refiere a microorganismos como las bacterias, los virus y los hongos.

De conformidad con esta Directiva, también en la definición se incluye a cualquier material o agente biológico, incluso los que han sido modificados genéticamente, los llamados OMG. Lo más importante y común a estas sustancias es que pueden ser patógenas, sensibilizantes o tóxicas. Así pues, los agentes biológicos tienen la capacidad de afectar negativamente a la salud humana, animal o al ecosistema de distintas formas, pero desde el punto de vista humano hoy nos interesan los que tienen la capacidad de producir desde reacciones alérgicas relativamente leves a enfermedades graves, e incluso producir la muerte.

¿QUÉ SON LOS GRUPOS DE RIESGO DE LOS AGENTES BIOLÓGICOS?

La directiva mencionada exige que se clasifiquen los agentes biológicos en cuatro grupos de riesgo, en función del nivel de riesgo de infección y propagación.

- Grupo de riesgo 1 (GR1): agente biológico que resulte poco probable que cause enfermedad en el hombre.
- Grupo de riesgo 2 (GR2): agente biológico que pueda causar una enfermedad en el hombre y pueda suponer un peligro para los trabajadores; es poco probable que se propague a la colectividad; existen, generalmente, métodos de profilaxis o tratamientos eficaces.
- <u>Grupo de Riesgo 3 (GR3):</u> agente biológico que pueda causar una enfermedad grave en el hombre y presente un serio peligro

- para los trabajadores; existe el riesgo de que se propague a la colectividad; pero existe, generalmente, profilaxis o un tratamiento eficaz.
- <u>Grupo de Riesgo 4 (GR4):</u> agente biológico que pueda causar una enfermedad grave en el hombre y suponga un serio peligro para los trabajadores; existen muchas probabilidades de que se propague a la colectividad; no existen, generalmente, métodos de profilaxis o tratamientos eficaces.

¿CÓMO ENTRAMOS EN CONTACTO CON LOS AGENTES BIOLÓGICOS?

Una gran variedad de actividades puede ponernos en contacto con bacterias, virus u hongos, por ejemplo:

- La fabricación y utilización de agentes biológicos, que incluye, por ejemplo, el aislamiento, la producción, propagación, uso, tratamiento, llenado, transferencia, mezcla, suministro y eliminación.
- Contacto por razones profesionales con personas, animales, plantas, productos biológicos, objetos y materiales (si implica la liberación de agentes biológicos y el contacto con los mismos).

ROPA DE PROTECCIÓN CONFORME A LA UNE-EN 14126:2003

Según la Directiva 2000/54/CE de la UE sobre las sustancias biológicas, los empresarios y responsables corporativos tienen la obligación de proporcionar ropa de protección adecuada a sus trabajadores y usuarios.

¿Qué prendas protegen contra los agentes biológicos?

La norma europea EN 14126* define los requisitos de eficacia de los materiales con que se fabrica la ropa de protección frente a agentes infecciosos. Los métodos de ensayo que se especifican en esta norma se concentran en el medio que contiene los microorganismos como las partículas de polvo liquidas, en aerosol o sólidas. Debido a la heterogeneidad de los microorganismos, la norma no define los criterios de eficacia para tipos específicos de microorganismos. Este punto tan sutil debe analizarse en la evaluación del riesgo y en relación con el grupo de riesgo del agente infeccioso en sí mismo.

La norma europea sólo se refiere a los "materiales" específicamente y no establece ningún requisito sobre la eficacia

ABSLab ABSLa ABSLa

ante los agentes infecciosos en las costuras. Dado que los virus, las bacterias y las esporas son lo suficientemente pequeños como para penetrar a través de las aperturas de las costuras, se recomienda utilizar trajes con costuras recubiertas y termoselladas. Los trajes de protección fabricados con tejidos conformes a la norma EN 14126, también, deben cumplir todos los mismos requisitos que los trajes que se especifican en la norma sobre el tipo de ropa de protección química correspondiente. Deben contar con el certificado CE como categoría III y pueden identificarse por el pictograma de "Riesgo Biológico". Los tipos de prendas de protección contra agentes biológicos se desglosan como se aprecia en la Tabla 1.

Tabla 1.-Clasificación de la ropa de protección según su construcción y especificación de uso.

ROPA DE PROTECCIÓN RECOMENDADA CONTRA AGENTES INFECCIOSOS						
MODELOS			GF			
		COSTURA	1	2	3	4
			Poco probable que cause enfermedad	Pueden causar una enfermedad y constituir un peligro para los trabajadores	Pueden provocar una enfermedad grave y constituir un serio peligro para los trabajadores	Provocan una enfermedad grave y constituyen un serio peligro para los trabajadores
			RIESGO	DE PROPAC	ACIÓN COL	ECTIVA
			NO	SGO DE PROPAGACIÓN CO POCO PROBABLE PROBABLE		
5 B	Tyvek® 500 Xpert	COSIDA				
Υ 6 Β	PartiGuard®	COSIDA				
ОВ	ProteHo® HD Classic	COSIDA				
4 B	Tyvek® 600 Plus	COSIDA Y RECUBIERTA				
	SprayGuard®	COSIDA Y RECUBIERTA				
	ProteHo® ADVANCE MP	COSIDA Y RECUBIERTA				
3 B	Tyvek® 800 J	COSIDA Y RECUBIERTA				
	Tychem® 2000 C	COSIDA Y RECUBIERTA				
	JetGuard®	COSIDA Y RECUBIERTA				
	Tychem® 4000 S	COSIDA Y RECUBIERTA				
	Tychem® 6000 F	COSIDA Y RECUBIERTA				
	JetGuard® PLUS	COSIDA Y RECUBIERTA				
2 B	GasGuard® T2	COSIDA Y RECUBIERTA				
1a B-ET	Tychem® 10000 TK	TERMOSELLLADA				
	GasGuard® T1	TERMOSELLLADA				

Ensayos de materiales para la fabricación de Vestuario de Protección

La norma EN14126:2003 incluye los siguientes ensayos de materiales, realizados sólo sobre tejidos para la fabricación de Vestuario de Protección:

1. Resistencia a la penetración de sangre y flujos corporales (usando sangre sintética) – ISO 16603

La sangre sintética que se utiliza para este ensayo es una mezcla de celulosa, colorantes, disolución amortiguadora y agentes estabilizantes. Esto se denomina "prueba preliminar" y se utiliza para predecir la presión a la que puede esperarse que dicha prueba, mediante medios contaminados por bacteriófagos, penetre en el material (verTabla 2).

Tabla 2.-Clase según presión de exposición (kPa).

Clase	Presión Hidrostática (kPa)
6	20
5	14
4	7
3	3,5
2	1,75
1	0

 Resistencia a la penetración de Agentes Patógenos de transmisión hemática por medio de un bacteriófago (simulación de penetración de "virus") – ISO 16604

La prueba de virus y la clasificación se realizan siguiendo los mismos patrones que la norma ISO 16603; la única diferencia es que el contaminante utilizado es un bacteriófago Phi-X174, primer bacteriófago secuenciado por Sanger en 1977, en lugar de sangre sintética. Un bacteriófago es un virus de ADN de cadena circular que infecta a bacterias para replicarse dentro de ellas. El bacteriófago (Phi-X174) sirve como virus-tipo para simular otros virus patógenos para los humanos por su estabilidad. Es similar al VHC en forma y tamaño, pero también puede servir inferir resultados como si fueran otros tipos como VHB o VIH.

El uso de la protección contra patógenos debería ser evaluado, por los expertos según el caso y en condiciones de campo pues no son las mismas que en estos laboratorios, sobre todo cuando hablamos de patógenos de los GR3 y GR4 donde el riesgo es inevitable.

3. Resistencia a la penetración de líquidos biológicamente contaminados (penetración de bacterias en un entorno húmedo) – ISO 22610

Esta norma establece el procedimiento para probar la resistencia de los materiales a la penetración de bacterias en un entorno húmedo. En este método de ensayo se superpone el material donante contaminado por bacterias sobre el material de ensayo y se somete a frotamiento mecánico. En la Tabla 3 se muestran seis clases, que se definen en la norma, con sus tiempos de penetración correspondientes, en los que se indica el punto en que las bacterias penetran de forma demostrable en el material de barrera.

Tabla 3.-Tiempos de penetración mínimos para entrono húmedo según su clase.

Clase	Tiempo de paso (min)			
6	>75			
5	>60			
4	>45			
3	>30			
2	>15			
1	<15			

4. Resistencia a la penetración de aerosoles líquidos biológicamente contaminados – ISO/DIS 22611

Para probar el "efecto de barrera contra aerosoles biológicamente contaminados", se pulveriza una solución bacteriana (*Staphylococcus aureus*) mediante un aerosol sobre una membrana de nitrocelulosa sin protección (el tamaño de los poros de la membrana es de 0,45 µm aproximadamente) y otra muestra "protegida" con una muestra del material de la prueba para que, a continuación, se analicen ambas membranas y determine su carga bacteriana. Para clasificar los resultados se utiliza la relación de penetración, que es la relación de la carga de la membrana de nitrocelulosa sin protección frente a la carga de la membrana protegida con el material de prueba y se expresa en unidades log (verTabla 4).

Tabla 4.-Clase de protección frente a aerosoles.

Clase	Relación	
3	>5	
2	>3	
1	>1	

5. Resistencia a la penetración de partículas sólidas biológicamente contaminadas (penetración microbiana en un entorno seco) – ISO 22612

Para la prueba de "barrera contra partículas sólidas biológicamente contaminadas", se fija una muestra de material previamente esterilizado en el instrumento de la prueba sobre una placa de agar y se le administra polvo de talco contaminado con *Bacillus subtilis*. Durante la prueba, se agita todo el conjunto. Las partículas que penetran en el material se analizan tras la incubación de la placa de agar, donde se emplea una muestra de prueba no contaminada como elemento de control. Los resultados (valores medios de 10 resultados únicos en un momento determinado) se miden en unidades logarítmicas de penetración, según la Tabla 5.

Tabla 5.-Clase de protección frente a contaminación por contacto.

Clase	Penetración (log. de ufc*)			
3	≤1			
2	≤2			
1	≤3			

La efectividad de barrera que proporciona el tejido debería analizarse también con el agente infeccioso correspondiente en función de la forma del agente biológico, los niveles de exposición, la naturaleza del trabajo y el riesgo de infección cuando vamos a trabajar con organismos del GR3 y GR4. También debe tenerse en cuenta el tipo de costura y la robustez mecánica del material (ver Figura 2).



Figura 2.-Vestuario de protección de diferentes tipos.

PROTECCIÓN RESPIRATORIA FRENTE A RIESGO BIOLÓGICO

Las mascarillas para la protección contra el riesgo biológico (ver Figura 3) deben tener como requisito mínimo la conformidad con los requerimientos fundamentales indicados en la Directiva Europea 89/686/CEE (nuevo Reglamento UE 425/2016) otorgada por el cumplimiento de la normativa europea EN 149:2001+ A1: 2009 y, por consiguiente, marcados CE.



Imagen suministrada por la autoría

Figura 3.- Diferentes mascarillas para protección respiratoria.

La norma EN 149 clasifica los productos en las clases FFP1, FFP2 y FFP3 (*Filtering Face Piece*) con eficiencia filtrante creciente según su capacidad (ver Tabla 6).

Tabla 6.-Clasificación de máscaras filtrantes según sus capacidades de protección. (*) FPN: Factor de protección nominal: Es la relación existente entre la concentración de contaminante en el aire ambiental y la concentración en el aire inhalado por el 95% de los usuarios entrenados. Se calcula a partir de los valores de penetración total permitida y cuanto mayor sea su valor mayor será su capacidad protección.

Clase	Penetración permitida	FPN (*)
FFP1	<20% para partículas >5 µm	4
FFP2	<6% para partículas 2-5 µm	20
FFP3	<1% para partículas <5 µm	50

En las máscaras encontraremos otra nomenclatura según las siguientes:

- <u>NR</u>: para faciales no reutilizables; el límite de uso son 8 horas, un turno.
- R: para faciales reutilizables durante más de un turno de trabajo.
- <u>D</u>: si se efectuó el control de larga duración mediante la prueba de polvo de dolomita.

Las mascarillas autofiltrantes se han desarrollado para reducir al mínimo la exposición a contaminantes de origen biológico

difundidos en el aire, pero no excluyen completamente el riesgo de exposición, infección y enfermedad.

Quiero recordarles que el sistema filtrante es todo el conjunto de la máscara y no la pieza central, que tan sólo es una "válvula de exhalación" que aumenta el confort de uso de la máscara.

El nivel mínimo aceptable de protección cuando hablamos de Riesgo Biológico debería ser el que nos proporciona la mascarilla clase FFP2; aunque la recomendación es utilizar mascarilla de clase FFP3 en la medida de lo posible y sin válvula, pero es admitido su uso si la protección del producto no es necesaria.

La normativa técnica europea respecto de los EPI no contiene alguna referencia específica a los métodos de ensayo para medir la eficacia de los respiradores contra el riesgo biológico, pero indirectamente pueden haber sido efectuadas las siguientes pruebas que sí son obligadas para los dispositivos médicos para protección sanitaria (PS o Producto Sanitario) y que incluyen otras como:

- BFE (Bacterial Filtration Efficency) y FPR (Fluid Penetration Resistance): según la norma EN-14683:2005 para testar la eficiencia de filtración frente a bacterias y la eficiencia contra la penetración de fluidos, respectivamente.
- VFE (Virus Filtration Efficency): para ensayar la eficiencia de filtración a los virus y otros agentes (bacterias, parásitos, hongos) clasificados según la Directiva 200/54/CE como GR2 y GR3.

Especificaciones para dispositivos médicos (PS)

En la práctica hospitalaria acontece tener que utilizar los respiradores no solamente para proteger el personal sanitario, sino para amparar los pacientes inmunodeprimidos contra el contagio potencial transmitido por los individuos que entran en su contacto.

En este caso el dispositivo no constituye un equipo de protección individual, sino que se convierte en un aparato médico y por lo tanto debe ser conforme a los requisitos establecidos por las normas EN-14683:2005. Aunque los especialistas en protección estamos recomendando el uso de mascarillas de protección sin válvula en pacientes con enfermedad infecciosa; de no ser así, el paciente enfermo estaría protegido, pero podría estar propagando su infección a través de la válvula de exhalación.

En particular estos equipos tienen que ser sometidos a los siguientes ensayos (verTabla 7):

- <u>Eficiencia de filtración bacteriana (BFE):</u> la eficiencia de la máscara quirúrgica debe cumplir con el valor mínimo definido por el tipo correspondiente.
- Respirabilidad (P): la presión diferencial que la máscara quirúrgica ofrece al paso del aire. Puede exceder los límites previstos por la norma EN-14683 si cumple con los limites previstos por la EN 149:2001.
- Resistencia a la salpicadura (FPR): según ASTM F1862, indicado mediante la sigla R en la máscara.

Tabla 7.- Ensayos para equipos PS.

Test	Tipo I	Tipo I R	Tipo II	Tipo II R
Eficiencia de filtración bacteriana (BFE)(%)	>95	>95	>98	>98
Presión diferencial ΔP (PA)	<29,4	<49	<29,4	<49
Presión de resistencia (mm Hg)	No requiere	>120	No requiere	>120

El simple hecho de **llevar un equipo** de protección personal **no garantiza la protección.** El efecto protector de los trajes sólo puede garantizarse si la prenda se pone y se quita de forma correcta y si se cumplen los procedimientos de trabajo adecuados. Si se quita un traje de forma incorrecta, la persona que lo lleva puede contaminarse y, a su vez, multiplica el riesgo dado para las personas que participan en la quita de la ropa, desinfección de la persona y los desechos resultantes.

Finalmente, es importante insistir en el entrenamiento, conocimiento de las capacidades de los equipos y responsabilidad respecto al riesgo que estamos expuestos: mientras un derrame o incidente con químicos puede neutralizarse a corto plazo, una infección con patógenos muchas veces puede pasar inadvertida y puede suponer la propagación acarreando graves consecuencias; no sólo para la propia persona, sino también para la comunidad.



direccion.revista@secal.es





www.secal.es





¡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.



Un modelo al lado de los humanos

SUS CÉLULAS NOS ENSEÑAN LA PUERTA DE ENTRADA DEL CORONAVIRUS SARS-CoV-2.



Un análisis basado en estudios estructurales del coronavirus del SARS, y del SARS-CoV-2 de una década de duración (publicado, recientemente, en la prestigiosa revista *Journal of Virology*), pone de manifiesto que los cerdos, hurones, gatos y primates no humanos tienen enzimas ACE-2 que contienen residuos de aminoácidos muy favorables para que estos virus se unan y puedan penetrar. Por lo tanto, estas especies pueden servir como modelos animales o huéspedes intermedios para el coronavirus SARS-CoV-2. Por el contrario, en los ratones y ratas sus ACE-2 no tienen estas características y de momento, no nos pueden ayudar.





El SARS-CoV-2 penetra en la célula empleando como receptor a la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE-2), una exopeptidasa de membrana, presente, fundamentalmente, en el riñón, el endotelio, los pulmones y el corazón. La función de la ACE-2 es la trasformación de la Angiotensina l en Angiotensina 1-9 y de la Angiotensina II en Angiotensina 1-7. Estos productos finales tienen efectos vasodilatadores y, por tanto, reducen la tensión arterial.



Una vez más, gracias a ellos disponemos de un marco sólido que permite a las comunidades científicas de investigación básica, traslacional y de salud pública ideas predictivas que pueden ayudar a estudiar y combatir esta pandemia.







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.

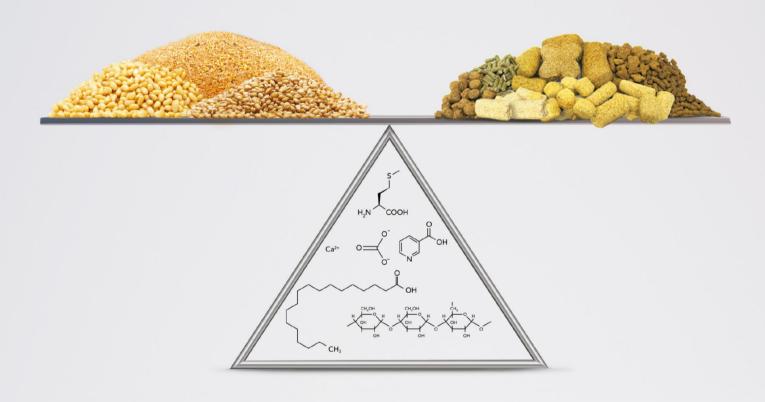
For more information, please contact us at services@eu.crl.com





Teklad Global Diets®

Ingredient selection is key to reducing rather than introducing variation



+

Envigo Teklad's fixed formula diets contain the same ingredients, in the exact same quantities, in every batch of diet. This translates to more consistent, reliable and meaningful research results.

Request a consultation with our experienced nutritionists askanutritionist@envigo.com

+

