# ANIMALES DE LABORATORIO

**INVIERNO 2021 / NÚMERO 88** 



sociedad española para las ciencias del animal de laboratorio

Técnicas de manejo no aversivo en ratón

Técnicas de perfusión intracardiaca en ratones: mejorando la bioseguridad y la metodología

Entrevista a Juan Rodríguez Cuesta



# 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



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

www.secal.es

**DIRECTORA** 

Lara Sedó Cabezón

direccion.revista@secal.e

**SUBDIRECTORA** 

María Granada Picazo Martínez

direccion.revista@secal.es

**EDITORES DE ESTILO E IMAGEN** 

Olga Fernandez Rodrigue

omfr75@yahoo.es

Rubén Mota Blanco

ramota@externo.cnic.es

**PUBLICIDAD** 

David Mayo Lopez

publicidad.revista@secal.e

**FOTO DE PORTADA** 

Suministrada por la autoria

**DISEÑO Y MAQUETACIÓN** 

IMPRIME

LPG

lpgtextil@gmail.cor

**DEPÓSITO LEGAL** 

M-1362-1999

### Ratones

Cuando esta revista vea la luz, habrán pasado unas semanas desde la publicación del artículo que ha mostrado la eficacia de la vacuna experimental llevada a cabo por el doctor Mariano Esteban junto con todo su equipo, en el 100% de los 22 ratones de la línea K18-hACE2. Estos animales han sido suministrados por los Laboratorios Jackson, los cuales llevan criando esta línea sin descanso desde comienzos de 2020, cuando se desató la pandemia.

A día de hoy, y aunque ya se empleen numerosas especies, no podemos negar que la investigación con ratones es la base fundamental para la cura y el tratamiento de muchas enfermedades. Por lo que no podemos dejar de recordar a Abbie Lathrop, maestra retirada por problemas de salud, pero una sagaz empresaria, quien convirtió la habilidad que tenía para la cría de ratones como mascotas—potenciando aquellos rasgos que los hacían más valiosos— en la proveedora ideal de ratones para los estudios científicos del genetista William Ernest Castle. Estos animales fueron mantenidos en el Instituto Bussey por C.C. Little, quien en 1929 fundaría los actuales Laboratorios Jackson. Algunas de las líneas que generó Abbie Lathrop en su granja de ratones todavía se venden.

Abbie Lathrop no se limitó sólo a la cría de ratones si no que inició también varios estudios científicos asentando conexiones entre la genética y el cáncer hereditario.

La historia de Abbie Lathrop daría para un artículo entero, pero valga este número de la revista y estas pequeñas líneas como homenaje a esos inicios y a esos ratones gracias a los cuales podemos reafirmarnos en el valor y la necesidad de la investigación con animales, cuando no haya una alternativa a ello.

¡Disfrutad de su lectura!

Dirección de la revista

# **EDITORIAL**

### 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)

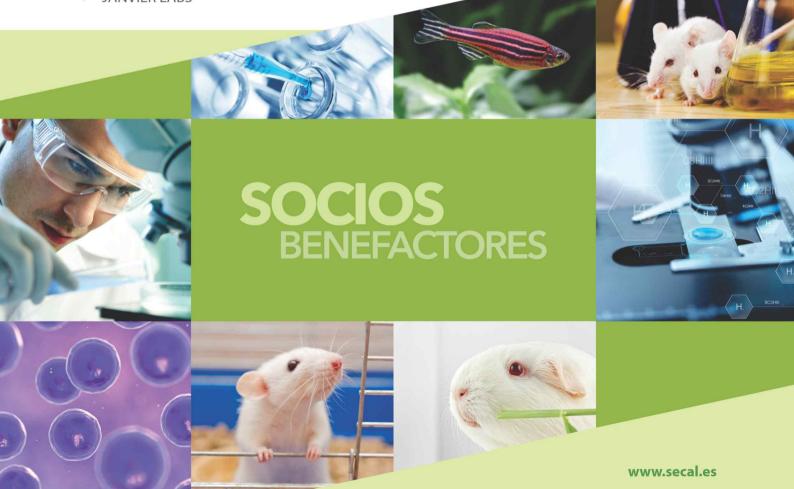
Clara Sánchez González Oscar Pintado Sanjuán † Carlos Carnero Guerrero Garikoitz Azkona Mendoza

# SOCIOS BENEFACTORES



- ANADE
- ANIMALARIA FORMACIÓN y GESTIÓN, S.L.
- ANTONIO MATACHANA, S.A.
- ARP LOGÍSTICA CLÍNICA S.L.
- BIOGEN CIENTÍFICA, S.L.
- BIOSIS
- ▶ CENTRO DE ESTUDIOS BIOSANITARIOS, S.L.
- ► CHARLES RIVER LABORATORIES ESPAÑA, S.A.
- DINOX, S.L.
- DYNAMIMED, S.L.
- ENVIGO RMS SPAIN, S.L.
- GRANJA SAN BERNARDO
- IDEXX BIOANALYTICS
- JANVIER LABS

- NORAY BIOINFORMATICS, S.L.U.
- ▶ PANLAB HARVARD APPARATUS, S.L.U.
- PROLABOR
- RETTENMAIER IBERICA, S.L. Y CIA SCOM
- SODISPAN RESEARCH, S.L.
- ▶ STERILTECH, S.L.
- STERIS IBERIA, S.A.
- ► TEMINOX C.B.
- VESTILAB C.R.C., S.L.U.
- VIVOTECNIA RESEARCH
- ZOONLAB GmbH





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 jesus.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 ilmbarrasa@qmail.com



Panorama JAVIER GUILLÉN IZCO jguillen@AAALAC.org



Control sanitario JOSEP M³ 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

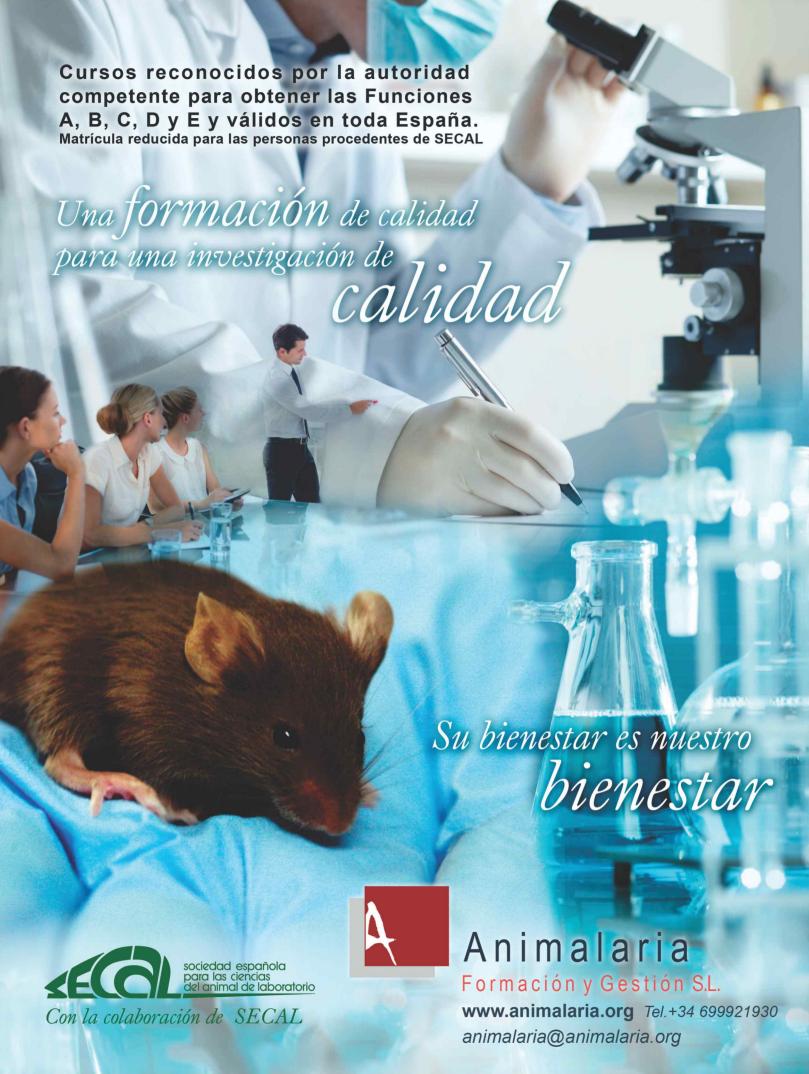


Indicios LOLA GARCÍA OLMO dgarcia@creballeida.org



Entrevista
AMAIA
VALDEMOROS RODRÍGUEZ
amaia.valdemoros.av.
external@almirall.com

Han colaborado en este número







### 3 EDITORIAL

### **8** NOTICIAS

- Presentación del Tercer Informe del Acuerdo COSCE de transparencia sobre el uso de animales de experimentación científica en España (2020).
- Asamblea general ordinaria de la SECAL.
- IX Jornada Científica de la SECAL.
- Nuevo portal comunitario de FELASA.
- Nuevos Nanocursos.
- ¡Novedad en la web! Un buscador de los servicios y productos que ofrecen los socios benefactores.
- Los animales usados para experimentación en España durante 2019.

### 17 ACTUALIDAD

- La modificación laboratorial de un virus oncolítico, permite a un niño superar un cáncer de retina.

### 18 TÉCNICAS

- Técnica de perfusión intracardiaca en ratones: mejorando la bioseguridad y la metodologia.

### 24 SEGURIDAD EN 5'

 El Síndrome del Trabajador Quemado gana importancia en la lista de dolencias de la OMS, y en los animalarios.

### 26 ALCUIDADO

- Técnicas de manejo no aversivo en el ratón.

### 31 PANORAMA

- ExpoBioterios Virtual 2020. Organizar un evento virtual sin renunciar a nada.

### 36 ¿Y TÚ, QUÉ OPINAS?

- Reproduciendo la sepsis: la importancia del "detalle".

### 38 REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA

Cuando una puerta se cierra, otra se abre para compensar.

### **44** ANESTESIAYANALGESIA

 Propuesta de protocolos anestésicos/analgésicos para rata, ratón, hámster y conejo en función de la severidad de los procedimientos.

### 50 INVITRO

- Alternativas al uso de animales en el estudio de la diabetes, también durante la gestacional.

### **61** BIENESTAR ANIMAL

- Alojamiento de conejos en el suelo: mejora en el bienestar animal y ventajas económicas.

### 67 ABS LAB

- Descontamina como puedas.

### 72 ENTREVISTA

 Entrevista a Juan Rodríguez Cuesta Consultor independiente en salud y bienestar animal y Vicepresidente de la SECAL.

### 76 UN MODELO AL LADO DE LOS HUMANOS

 El coronavirus causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) es el único coronavirus zoonótico que produce brotes frecuentes a partir del huésped reservorio cercano: el dromedario.



# Presentación del Tercer Informe del Acuerdo COSCE de transparencia sobre el uso de animales de experimentación científica en España (2020)

Palabras clave: transparencia, COSCE, animales.

El 21 de diciembre se presentó el Tercer Informe del Acuerdo COSCE de transparencia sobre el uso de animales de experimentación científica en España.

Este acuerdo, impulsado en 2016 por la Confederación de Sociedades Científicas de España (COSCE) y en que la SECAL tuvo un papel activo; es un código voluntario de buenas prácticas que, junto a la legislación vigente, proporciona un marco para fomentar actividades de transparencia y comunicación sobre el uso de animales en investigación científica. Un total de 140 instituciones, de las que más del 80% son centros de investigación y universidades.

Las instituciones adheridas al acuerdo se comprometen a ser transparentes sobre cuándo, cómo y por qué utilizan animales en la investigación; a mejorar la comunicación con los medios y la sociedad; a ser proactivos en promover eventos para que la sociedad conozca la investigación animal; y a informar anualmente sobre las actividades realizadas y compartirlas.

Este Informe se presentó a los medios de comunicación en un acto virtual (ver Figura 1) inaugurado por **Perla Wahnon** –presidenta de la COSCE – en el que han intervenido: **Margarita del Val** –coordinadora de la Comisión COSCE de Estudio del Uso de Animales en Investigación Científica, vocal de Ciencias de la Vida y de la Salud de la Junta de Gobierno de COSCE e Investigadora del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa del CSIC y de la Universidad Autónoma de Madrid –, **Javier Guillén** –miembro de la Junta de Gobierno de la *European Animal Research Association* (EARA) y director para Europa y Latinoamérica de AAALAC Internacional –, **Lluís Montoliu** –investigador del Centro Nacional de Biotecnología del CSIC y representante de los OPIs (Organismos Públicos de Investigación) en la Comisión COSCE –, e **Isabel Blanco** – presidenta de la SECAL y responsable del Animalario del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) –.



Imagen suministrada por la autoría

Figura 1.- Ponentes que han intervenido en la presentación del informe. De izquierda a derecha y de arriba a abajo: Albert Concepción, Lluís Montoliu, Javier Guillen, Isabel Blanco, Margarita del Val y Perla Wahnon.

Entre las principales conclusiones del informe, se destaca que:

- 1. El nivel de transparencia de las instituciones científicas en el uso de animales para la investigación continúa aumentando.
- Casi la mitad de las instituciones adheridas al Acuerdo COSCE de transparencia sobre el uso de animales de experimentación científica en España informan a los medios de comunicación sobre el uso de animales en sus investigaciones.

### **ANIMALES DE LABORATORIO**

INVIERNO 2021 / NÚMERO 88

- 3. Cerca del 70% de las entidades ha llevado a cabo alguna actividad pública relacionada con el uso de animales en investigación o tiene intención de hacerlo.
- 4. Los modelos animales son fundamentales para el desarrollo de tratamientos y vacunas para cualquier infección y han sido determinantes en la rapidez del desarrollo de la vacuna contra el SARS-CoV-2.
- Tercer Informe COSCE: https://cosce.org/informe-anual-2020-delacuerdo-de-transparencia-sobre-el-uso-de-animales-enexperimentacion-cientifica-en-espana/
- Acuerdo de Transparencia en COSCE: https://cosce.org/acuerdo-detransparencia/

- EUROPA PRESS La transparencia en el uso de animales para la investigación aumenta en el último año, según entidades del Acuerdo COSCE: https://www.europapress.es/ciencia/noticia-transparenciauso-animales-investigacion-aumenta-ultimo-ano-entidadesacuerdo-cosce-20201221153727.html
- SERVIMEDIA Unos 800.000 animales se usan al año en España para experimentación o investigación: https://www.diariosigloxxi.com /texto-s/mostrar/392303/unos-800000-animales-usan-ano-espanaexperimentacion-investigacion
- EFE/LA VANGUARDIA/EL DIARIO.ES/DIARIO MÉDICO COSCE: sin uso animales en investigación, la vacuna habría tardado mucho más: https://www.lavanguardia.com/vida/20201221/6139292/cosceanimales-investigacion-vacuna-habria-tardado-mas.html

### Asamblea general ordinaria de la SECAL

Palabras clave: asamblea, SECAL, virtual.

La pandemia por la COVID-19 también ha afectado la celebración de la Asamblea General que debía tener lugar presencialmente en Madrid. Finalmente, se pudo realizar de forma virtual. el 12 de noviembre de 2020 a las 16:30.

Este fue el orden del día:

 Aprobación del Acta de la anterior Asamblea General Ordinaria.

- 2. Informe de Presidencia.
- 3. Informe de Secretaría.
- 4. Informe de Tesorería.
- 5. Informe de Vocalías.
- 6. Ruegos y preguntas.



### IX Jornada Científica de la SECAL

Palabras clave: SECAL, jornada, virtual.

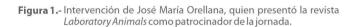
El pasado 16 de diciembre tuvo lugar la IX Jornada Científica de la SECAL marcada por la COVID-19 y, por primera vez, se realizó de forma virtual. Esta jornada se realiza de forma bienal y el formato online de este año ha permitido la asistencia de gente de diferentes países como: Brasil, Ecuador, Argentina, Colombia, Portugal, Francia o EEUU.

También las inscripciones fueron todo un éxito, con más de 550 personas registradas.

La Jornada se estructuró en cuatro ponencias:

Inauguración a cargo de **José María Orellana**, donde presentó la revista *Laboratory Animals* como patrocinador de la jornada e impulsor de diferentes iniciativas para el fomento de la formación (ver Figura 1).





Tras la inauguración, **Garikoitz Azkona** (Departamento de Procesos Psicológicos Básicos y su Desarrollo - UPV/EHU),

presentó "Las expresiones faciales y su relación con el bienestar de los animales" en la que habló de las expresiones faciales de los animales, la base neurológica de las emociones y comportamientos, y el análisis consecuente (ver Figura 2).



lmagen suministrada por la autori

Figura 2.- Garikoitz Azkona durante su intervención.

Esto sirvió como marco teórico para introducir el segundo seminario a cargo de **Violeta Solís** (Responsable de bienestar animal en GlaxoSmithKline) "Uso de la escala de expresión facial de dolor en ratón en ensayos de toxicidad preliminar" y cómo pueden ser útiles en el caso concreto del bienestar con las diferentes metodologías empleadas en la manipulación de los animales (ver Figura 3).



Imagen suministrada por la auto

Figura 3.- Violeta Solís durante su intervención.

### **ANIMALES DE LABORATORIO**

INVIERNO 2021 / NÚMERO 88

La jornada finalizó con "Técnicas de Imagen Molecular en Investigación Oncológica" a cargo de **Francisca Mulero** (Responsable de la Unidad de Imagen Molecular del CNIO), con ejemplos de los diferentes tipos de técnicas de imagen sobretodo *in vivo*, y su alta calidad y resolución (ver Figura 4).



Figura 4.- Francisca Mulero durante su intervención.

Agradecemos a los ponentes y a la Vocalía de Comunicación (ver Figura 5) por la calidad de las presentaciones y el esfuerzo para hacer posible esta jornada en un año complicado.



Figura 5.- Carlos Carnero, vocal de comunicación de la SECAL, durante su intervención en la Jornada de la SECAL.



revista de la SECAL!

### Nuevo portal comunitario de FELASA

Palabras clave: web, FELASA, portal.

La web de FELASA presenta un aspecto totalmente renovado, con una mejor usabilidad y adaptación para dispositivos móviles. Encontramos los contenidos de siempre, como las recomendaciones de los grupos de trabajo, los cursos acreditados, los webinars gratuitos o la agenda de eventos y congresos, pero con una navegación más amigable.

A nivel interno, los grupos de trabajo se estructuran en comunidades, facilitando el trabajo colaborativo. Visita todas estas novedades en https://felasa.eu/ (ver Figura 1).

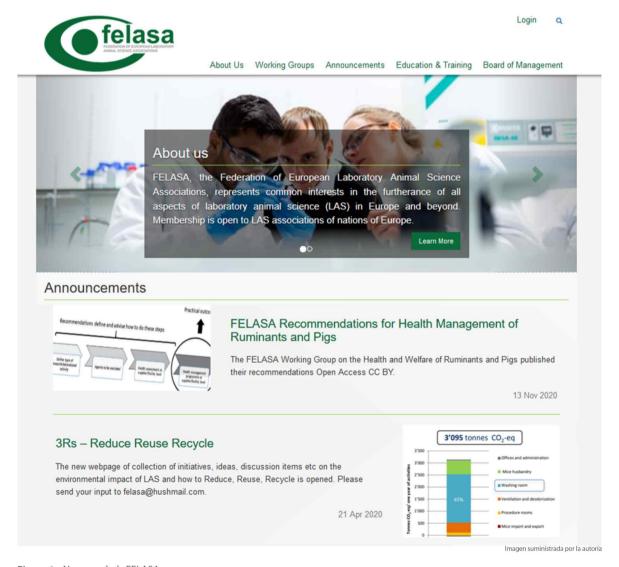


Figura 1.- Nueva web de FELASA.



### **Nuevos Nanocursos**

Palabras clave: formación, SECAL, plataforma.

Con el objetivo de promocionar la formación continuada, en 2018 la vocalía de formación de la SECAL realizó un convenio con Nanocursos. Se trata de una plataforma on-line de la Universidad Miguel Hernández que ofrece cursos impartidos por profesionales en activo con gran experiencia en el sector, de formato corto y temáticos.

A finales de 2020, el listado de Nanocursos se actualizó (ver Figura 1), y ya lo podéis consultar en la web https://secal. es/nanocursos/ clasificado según la función a la que corresponden. Recordad que, a los socios de la SECAL, se les aplica un importante descuento en el precio.

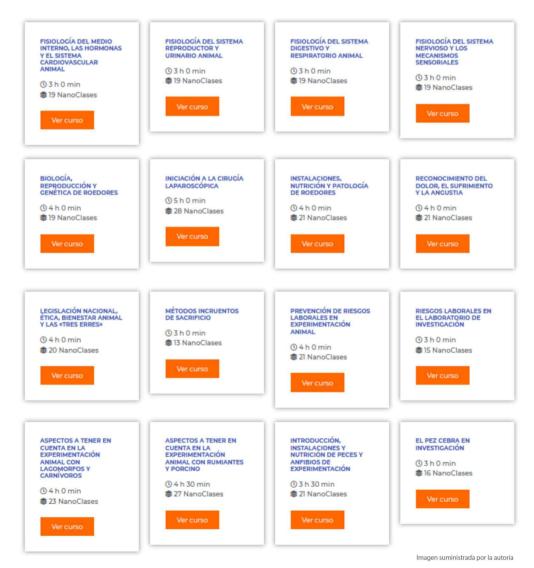


Figura 1.- Catálogo de los Nanocursos que puedes encontrar en la web.

# ¡Novedad en la web! Un buscador de los servicios y productos que ofrecen los socios benefactores

Palabras clave: SECAL, web, benefactores.

Como novedad, en la web de la SECAL encontraréis un buscador de los servicios y productos que ofrecen nuestros socios benefactores (ver Figura 1). En el menú lateral debéis seleccionar

el servicio y/o producto, mostrándose los socios que los ofrecen con sus datos de contacto.



Figura 1.- Buscador de los servicios y productos que ofrecen los socios benefactores en la web de la SECAL.

# Los animales usados para experimentación en España durante 2019

Palabras clave: MAPA, animales, estadísticas.

El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) publicó en noviembre los últimos datos oficiales de usos de animales en España durante 2019. De acuerdo con la Directiva 2010/63/UE en su artículo 54, "los Estados miembros recopilarán y publicarán cada año información estadística sobre la utilización de animales en procedimientos, incluidos datos sobre la severidad real de los procedimientos y sobre el origen y especie de los primates no humanos utilizados".

Los datos publicados refieren 817.742 usos de animales para 2019 (ver Figura 1) un 2,2% menos respecto a los reportados en 2018 (836.096). Es decir, se registran alrededor de ochocientos mil usos de animales en España anualmente.



Figura 1.- Número total de animales usados por año en España desde 2009. Fuente: Lluís Montoliu.

**Sobre la finalidad de los usos, mayoritariamente (86%) se destinan a investigación científica,** seguidos de usos reglamentarios, docencia y otros usos, en porcentajes mucho menores.

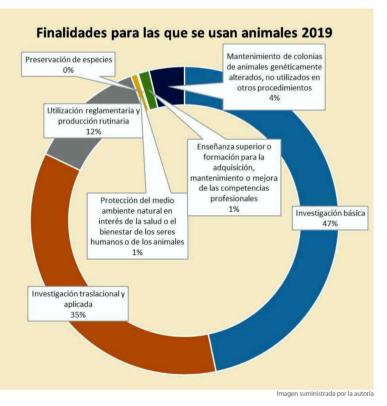


Figura 2.- Finalidad para la que se usaron los animales durante 2019. Fuente: MAPA.

La mayor parte de animales que se usan son roedores (63,5%), seguido de peces (17,3%) y aves (12,4%). Dentro de los roedores, la especie principal es el ratón, registrándose 460.761 usos (56,4%) durante 2019. Tras estas tres especies, aparecen otras cuyo uso es importante pero alejado de esos porcentajes: 20.586 conejos (2,52%), 9.410 cerdos (1,15%), 2.261 ovejas (0,28%), 1.463 perros (0,18%), y 1.155 vacas (0,14%). Finalmente, completan los datos otras especies con usos muy inferiores: 542 gatos (0,07%), 348 cabras (0,04%), 281 équidos (0,03%) y 229 primates no humanos (0,03%).

- Datos completos del informe: https://www.mapa.gob.es/es/ ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/informede usodeanimalesen2019\_tcm30-550894.pdf
- Histórico de informes desde 2009: https://www.mapa.gob.es/es/ ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/bienestanimal/ en-la-investigacion/Informes\_y\_publicaciones.aspx



purification, and critical monitoring equipment. Expect accuracy, consistency and variable-free

Contact us for more information. Email: sodispan@sodispan.com



AvidityScience.com

WATER SYSTEMS | LAB EQUIPMENT & SUPPLIES | CONTROL & MONITORING

SERVICE

INVIERNO 2021 / NÚMERO 88

### La modificación laboratorial de un virus oncolítico, permite a un niño superar un cáncer de retina

Palabras clave: virus oncolítico, retina, vector viral.

En base a estudios previos en modelos animales, dónde se había determinado que este virus ataca y destruye las células cancerígenas del retinoblastoma o cáncer de la retina, un equipo de investigadores del Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona y de la compañía biotecnológica VCN Biosciences (empresa de Grifols) ha desarrollado un tratamiento pionero en el mundo, que ha permitido evitar que un niño que ya perdió un ojo a consecuencia de un cáncer de la retina pierda el otro y quede totalmente ciego.

### EL RETINOBLASTOMA Y SU TRATAMIENTO HASTA LA ACTUALIDAD

El retinoblastoma es el tumor ocular más frecuente en la población infantil, se diagnostican aproximadamente 8.000 niños y niñas cada año en el mundo. Este cáncer se origina en el proceso de desarrollo de la retina, durante los primeros años de vida. En la actualidad, y siempre que esté indicada la preservación del ojo, en el Hospital Sant Joan de Déu, los niños afectados son tratados con quimioterapia intra-arterial como primera opción. Se les introduce un largo y fino catéter por la arteria femoral accediendo por la ingle, y se conduce hasta la arteria oftálmica para –una vez allí-administrar localmente la quimioterapia. En algunos casos, también se inyecta quimioterapia dentro del ojo, en el humor vítreo.

En algunos casos, sin embargo, el tumor no responde a estos tratamientos y los oftalmólogos no tenían, hasta ahora, más opción que enuclear el ojo afectado para evitar que el cáncer se extendiera a otros órganos del cuerpo, ya que entonces las posibilidades de curación son muy bajas.

### EL NUEVO TRATAMIENTO SURGE DE ESTUDIOS CON **MODELOS ANIMALES**

El desarrollo de este nuevo tratamiento contra el cáncer de retina es el resultado de 5 años de investigación (también con modelos animales), poniendo en valor la investigación traslacional (transferencia de conocimiento de la hospitalización al laboratorio y viceversa) que se lleva a cabo en el hospital.

El tratamiento, administrado en el marco de un ensayo clínico, consiste en inyectar dentro del ojo afectado (ver Figura 1) un virus modificado genéticamente con capacidad oncolítica, que selecciona, ataca y destruye las células cancerígenas.

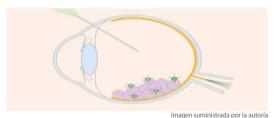


Figura 1.- Inyección dentro del ojo afectado de un virus oncolítico, que selecciona, ataca y destruye las células cancerígenas. Fuente: Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona.

El tratamiento que ha recibido Félix (ver Figura 2) es un adenovirus - un virus común que normalmente causa síntomas de resfriado, y que ahora algunos investigadores internacionales están utilizando para desarrollar una vacuna contra la COVID-19- modificado en el laboratorio de VCN Biosciences para que sea capaz de identificar, infectar y multiplicarse en las células cancerígenas. Esto permite al virus oncolítico identificar y atacar de manera selectiva las células cancerígenas y dejar indemnes las células sanas.



Figura 2.- Félix en una revisión en el Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona para comprobar la evolución del tratamiento con el virus oncolítico. Fuente: Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona.

- Nota de prensa de l'Hospital Sant Joan de Déu: https://www.sjd hospitalbarcelona.org/es/un-virus-oncolitico-pionero-mundopermite-que-un-nino-supere-un-cancer-retina
- Artículo en La Vanguardia sobre esta noticia: https://www.la vanguardia.com/ciencia/20201127/49742032656/retinoblastomatumor-retina-nino-virus.html



# Técnica de perfusión intracardiaca en ratones: mejorando la bioseguridad y la metodología

Pedro Llontop Santisteban¹, Alicia Sánchez Martín¹, Lidia Albadalejo Navarro¹, Paula Barnese García¹, Silvia Rivero Vadillo¹, Francisco Sánchez Cobos¹, Ma Cruz Rodríguez-Bobada² y Fernando Asensio Rubio¹¹Unidad de Medicina y Cirugía Experimental, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (IiSGM), Madrid²Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Clínico San Carlos, Madrid

Palabras clave: percusión, fijación, ratón.

### INTRODUCCIÓN

La fijación por perfusión es una técnica básica muy utilizada en animales de experimentación que permite obtener muestras histológicas preservando las características de los tejidos, mediante una fijación controlada y uniforme. La solución de fijación se inocula en el sistema circulatorio del animal, actuando desde el interior hacia el exterior de los órganos. Esto permite una mejor conservación de los órganos siempre y cuando la técnica se realice con éxito.

Uno de los líquidos fijadores utilizado en la perfusión es el paraformaldehído (PFA) que es un agente liberador de formaldehído. Su utilización puede tener efectos nocivos sobre la salud del técnico que realiza la práctica, como pueden ser: tos, dolor de garganta, sensación de quemazón, dificultad respiratoria, enrojecimiento, dolor en piel y ojos, quemaduras y, además, es un potencial carcinógeno, según la Ficha Internacional de Seguridad Química (ICSCs, del inglés *International Chemical Safety Cards*) de la Organización Internacional del Trabajo (ILO, del inglés *International Labour Organization*)<sup>1</sup>.

Por ello, su utilización requiere de equipos de protección individual (EPI) tales como: mascarilla con filtro para gases orgánicos y partículas (modelo FFP 3 o similar), guantes y traje de protección/manguitos, gafas de montura integral y algún equipo de protección colectiva (EPC), como puede ser una cabina de extracción de gases (con filtro adecuado para dicho compuesto) (ver Figura 1). Todos estos equipos están destinados a proteger al operador de la inhalación de vapores nocivos y ante cualquier derrame de este químico.



Imagen suministrada por la autor

Figura 1.- Detalle de la cabina de extracción de gases.

Una de las dificultades que nos encontramos al realizar la técnica de perfusión es la incomodidad y la restricción de movimientos debido al espacio limitado en el interior de la cabina de extracción de gases, ya que es habitual utilizar plataformas de considerables dimensiones para colocar el ratón. Estos soportes, de corcho u otros materiales, se posicionan con cierta inclinación para que, por gravedad, discurra el líquido de perfusión y se deposite en una bandeja que también suele ser grande (ver Figura 2A).

Además, hay que tener en cuenta la dificultad añadida que se produce por el hecho de que el operador debe sujetar y mantener inmóvil la aguja insertada en el corazón del ratón mientras se perfunde con el PFA (ver Figura 2B). Esta circunstancia puede



INVIERNO 2021 / NÚMERO 88



suponer un elemento de riesgo, tanto para el operador como para el buen desarrollo de la técnica, sobre todo cuando se pretende perfundir a varios animales en la misma sesión.

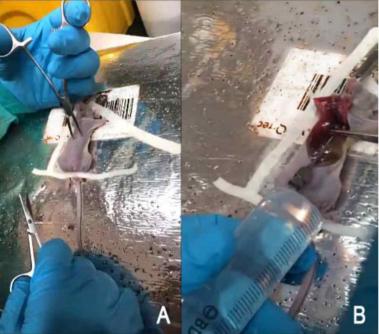


Imagen suministrada por la autoría

Figura 2.-Técnica de perfusión comúnmente utilizada. A. Posicionamiento del ratón sobre la superficie de un corcho con un plano inclinado. B. Sujeción de la jeringa con los líquidos de lavado y fijación durante la perfusión intracardiaca.

El presente trabajo tiene como objetivo principal la mejora de la técnica de perfusión intracardiaca en ratón, utilizando material de laboratorio de uso común que, habitualmente, está disponible en cualquier centro de investigación.

Este objetivo principal se alcanza al aplicar nuestra metodología a través de tres objetivos secundarios:

- Mejorar la seguridad del personal, reduciendo los riesgos de exposición al PFA.
- Facilitar el trabajo del operador mientras se realiza la perfusión, ya que no necesita mantener sujeta la aguja dentro del corazón durante todo el tiempo que dura la perfusión.
- Optimizar el uso de recursos, utilizando material de pequeño tamaño y simplificando el trabajo en espacios reducidos.

#### **MATERIAL NECESARIO**

- Bomba peristáltica.
- Equipo de infusión/Sistema de venoclisis con llave de tres pasos.
- Aguja de 25G sin punta y 21G normal.
- Solución de lavado (PBS 1x o Solución salina).
- Heparina sódica.
- Paraformaldehído al 4%.
- Recipiente de poliestireno.
- Hielo.
- Embudo.
- Caja vacía de puntas para micropipetas de 1000 μl.
- Pipeta Pasteur de 16 cm de largo.
- Bandeja.
- Esparadrapo de tela.
- Material de disección: pinzas y tijeras de cirugía recta.
- Papel de filtro.
- EPIs: mascarilla con filtro integrado para químicos, manguitos desechables, guantes y gafas protectoras.

### PREPARACIÓN DEL OPERADOR

Como hemos comentado en la introducción, la exposición al PFA puede causar tos, dolor de garganta, sensación de quemazón, dificultad respiratoria, enrojecimiento, dolor en piel y ojos, quemaduras y es un potencial carcinógeno. Por ello, tenemos que protegernos antes de empezar mediante una mascarilla con filtro integrado para químicos, manguitos desechables, gafas protectoras y guantes para evitar el contacto directo con la piel. Además, la cabina de extracción de gases evitará que podamos inhalarlo.

### PREPARACIÓN DE LA ZONA DETRABAJO

Una vez encendida la cabina de extracción de gases y tras esperar unos minutos, se pondrá papel de filtro, para solventar los posibles derrames y, seguidamente, prepararemos la bomba peristáltica colocando los tubos flexibles de un sistema de suero dispuestos en forma de "Y". Este tubo flexible estará conectado por una llave de tres pasos, donde una de las ramas llevará suero heparinizado y la otra llevará PFA al 4%. Estos dos tubos convergerán en una tercera rama conectada a través de una llave de 3 pasos, con un tubo al que se le acoplará una aguja de 25G a la que previamente se le ha cortado el bisel para dejarla con punta roma (ver Figura 3A). Es importante purgar antes los tubos para evitar burbujas de aire².

# **TÉCNICAS**

El PFA 4% se colocará en un recipiente opaco o cubierto con papel de aluminio para evitar la luz directa, y se mantendrá frío colocándolo sobre hielo y en otro recipiente se colocará la solución de lavado (PBS 1x o Solución salina) con heparina 50 Ul/ml³. Es conveniente dejar listas ambas soluciones en los tubos de tal forma que siempre salga primero la solución de lavado.

Por otro lado, se colocará una caja vacía de puntas de micropipetas que servirá de soporte para colocar al ratón, a la vez que recogerá el líquido resultante de la perfusión (ver Figura 3B).

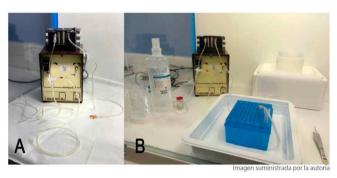


Figura 3.- Preparación de la zona de trabajo A. Bomba peristáltica con tubuladura en forma de "Y". B. Caja vacía de puntas de micropipetas que servirá de soporte al ratón y será el lugar donde se recogerán los residuos de la perfusión. La bandeja de plástico servirá de contención ante cualquier derrame, cuando se realizan varias perfusiones seguidas.

Cuando se van a perfundir varios ratones en la misma sesión (uno a continuación del otro), se colocará debajo una cubeta de plástico por si se llegara a rebalsar el líquido. Para mantener la aguja roma en el corazón, utilizaremos un soporte que fabricaremos cortando y dando forma a una pipeta Pasteur con las dimensiones que se muestran en la Figura 4. Al lado, se tendrá listo el material de disección y esparadrapo.

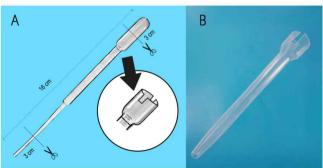


Imagen suministrada por la autori

**Figura 4.-** Preparación de la pipeta Pasteur. **A.** Dimensión y partes a recortar de los extremos de la pipeta. La flecha negra muestra el detalle de la parte superior, donde se observan 2 muescas paralelas del ancho del tubo de venoclisis. **B.** Modelo listo para ser colocado en la caja de puntas.

#### ANESTESIA DEL RATÓN

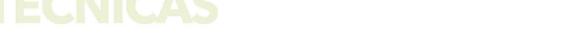
Para realizar la perfusión, el ratón será anestesiado por vía intraperitoneal (IP) con una combinación de Ketamina (150 mg/kg) y Xilacina (12 mg/kg). Cuando se haya alcanzado un plano anestésico profundo, se llevará a la cabina de extracción de gases para iniciar la perfusión.

### **TÉCNICA**

- 1. Tras ser anestesiado el ratón y una vez comprobado que está en el plano anestésico adecuado, verificando la ausencia de reflejo podal, se colocará en posición decúbito supino sobre una caja vacía de puntas para micropipetas de 1000 µl, que servirá de apoyo al animal y para la recogida de los líquidos de lavado y fijación. Si se realizan varias perfusiones seguidas, es recomendable colocar debajo una cubeta (ver Figura 3B).
- 2. Estirar y sujetar las extremidades del ratón con la ayuda del esparadrapo.
- Colocar una tira de esparadrapo tapando uno de los agujeros localizados entre la cabeza y la extremidad superior derecha (ver Figura 5A).
- 4. Colocar la pipeta Pasteur cortada en el agujero de la esquina inferior derecha de la caja de puntas. Esto nos servirá como soporte para la sujeción del tubo que conecta directamente con el corazón del animal en el proceso de la perfusión (ver Figura 5A).
- 5. En caso de ratones con pelo, lavar la superficie del ratón con etanol 70° para permitir mantener la zona limpia y sin restos capilares.
- 6. Localizar el manubrio del esternón como referencia anatómica para realizar una incisión en la piel. Ésta se extenderá de forma perpendicular al esternón a ambos lados (línea discontinua roja, ver Figura 5B), intentando que llegue lo más cercano a la superficie de la caja de puntas.



INVIERNO 2021 / NÚMERO 88



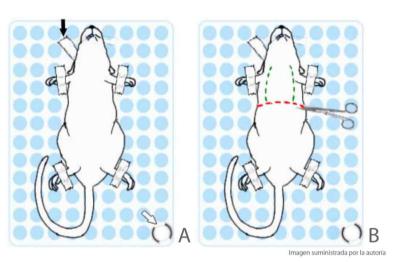


Figura 5.- Posición en decúbito supino del ratón. A. Sujeción del ratón por las extremidades con tiras de esparadrapo. Colocar otra tira de esparadrapo al lado de la cabeza (flecha negra). La pipeta Pasteur se colocará en el agujero del extremo inferior derecho (flecha blanca). B. Lugar de incisión para acceder a la caja torácica del ratón.

- 7. Acceder al diafragma y realizarle un corte para conseguir despegarlo de la caja torácica.
- 8. Hacer cortes en piel y costillas, a ambos lados del esternón (línea discontinua verde, ver Figura 5B). Inmediatamente, elevar la parrilla costal en dirección craneal y sujetarlo con una aguja de 21G haciéndolo coincidir con el esparadrapo previamente colocado al lado de la cabeza del ratón (ver Figura 6A).
- 9. Una vez localizado el corazón, insertar la aguja de 25G con punta roma que está acoplada al tubo que contiene la solución de lavado con heparina, en el ventrículo izquierdo (por el ápex). A continuación, hacer coincidir el tubo en las 2 ranuras de la parte superior de la pipeta Pasteur que previamente habremos colocado en la caja de puntas (ver Figura 6B) y abrir la llave para iniciar el lavado. En este punto, es importante realizar rápidamente una incisión en la aurícula derecha para permitir el escape de la circulación de retorno de los líquidos de lavado.

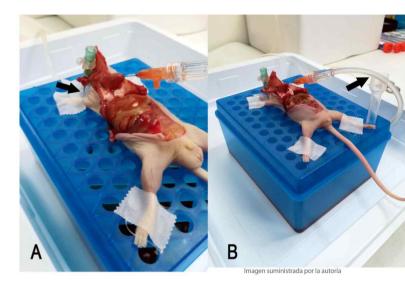


Figura 6.- A. Sujeción de la parrilla costal con la ayuda de una aguja de 21G que atraviesa el esparadrapo colocado al lado de la cabeza del ratón (flecha). B. Inserción del tubo en la parte superior de la pipeta Pasteur (flecha).

- 10. La velocidad y tiempo de lavado influirá en la correcta eliminación de la sangre, estimándose un volumen aproximado de 20-30 ml en 2-3 min, respectivamente, hasta observar un blanqueamiento de los órganos.
- 11. Con la ayuda de la llave de 3 pasos, cambiar a la solución fijadora dejando pasar 100 ml en 10 min de PFA al 4%.
- 12. Una fuerte contracción muscular nos indica una correcta fijación del animal. En este momento se retirará la aguja y se procederá a la extracción de los órganos deseados.
- 13. Después del fijado se realizará la disección de los órganos y se almacenarán en PFA al 4%.
- 14. Para la limpieza y el purgado de los tubos de la bomba de perfusión, habrá que colocar los 3 extremos de los tubos haciéndoles coincidir con los agujeros de la caja de puntas que contiene los restos de la perfusión e iniciar la salida de los líquidos hasta ver que estén vacíos (ver Figura 7A). A continuación, se pasará suero fisiológico para eliminar los restos de PFA y así evitar su deterioro, y, por último, purgar la tubuladura para que no quede contenido líquido.

# **TÉCNICAS**

15. Dentro de la cabina de extracción de gases, habrá que utilizar un embudo para recoger los deshechos de la perfusión almacenado en la caja de puntas, dentro de una garrafa de residuos (ver Figura 7B).

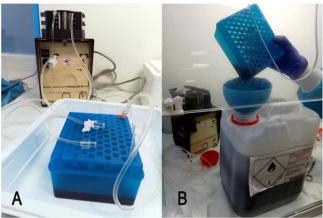


Imagen suministrada por la autoría

**Figura 7.-** Limpieza y eliminación de líquidos y restos de la perfusión. **A.** Limpieza y purgado de los tubos flexibles. **B.** Eliminación de los residuos de la perfusión en su garrafa correspondiente, que deberá estar debidamente etiquetada.

### **VENTAJAS Y DESVENTAJAS**

La utilización de estos materiales de laboratorio para realizar la fijación por perfusión de un órgano supone una mejora en el aprovechamiento del área de trabajo, ya que al ser materiales de pequeño tamaño proporcionan una mayor comodidad en la ejecución del procedimiento en sí. Este beneficio se ve incrementado con la introducción y el remodelado de la pipeta Pasteur, que sirve de soporte al tubo que lleva la aguja introducida en el corazón del animal. De esta forma, ya no es necesario que el operador permanezca todo el tiempo sujetándola, lo que conlleva a una mejor ergonomía y un mayor rendimiento en el trabajo desde el primer ratón perfundido hasta el último.

Una ventaja más es que brinda una mayor protección durante el procedimiento, ya que los residuos de la perfusión quedan retenidos en un recipiente parcialmente cerrado, como es la caja de puntas de micropipetas, evitando pequeñas perdidas o salpicaduras.

Otra mejora se encuentra en la limpieza y eliminación de los residuos tóxicos contenidos en la caja de micropipetas, ya que la misma se realiza dentro de la cabina de extracción de gases.

Por el contrario, dentro de las escasas desventajas que se pueden mencionar, estaría el límite de llenado de la caja de puntas y la fabricación del soporte de la aguja roma, a partir de la pipeta Pasteur, aunque este último punto es de gran sencillez.

#### CONCLUSIONES

Esta nueva técnica de perfusión, mediante la utilización de materiales de laboratorio disponibles en cualquier centro de investigación, supone una considerable mejora en la seguridad del procedimiento, con una menor exposición al PFA; en la reproducibilidad del experimento, en la calidad de los datos y en la optimización de los recursos gracias a un mejor aprovechamiento del área de trabajo, limitado por las dimensiones de la cabina de extracción de gases.

#### **BIBLIOGRAFÍA**

- Peñalver Paolini M.A., Mazón Cuadrado L., Rosado María M. et al. ¿Se puede controlar el Formaldehído? Revista de la Asociación Española de Especialistas en Medicina del Trabajo. 2016; 25:204-10.
- Gage G.J., Kipke D.R., and Shain W. Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents. Secondary Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents. 2012. http://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.listcards3?p\_lang=en.
- 3. Stefanutti E., Sierra A., Miocchi P., et al. Assessment of the effects of different sample perfusion procedures on phase-contrast tomographic images of mouse spinal cord. Journal of Instrumentation. 2018;13:C03027-C27.

### 17 a 19 - noviembre - 2021

# **XVI** Congreso

de la Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio

seca leida

Fecha límite de envío de comunicaciones: 3 de septiembre de 2021

Resolución de comunicaciones: hasta el 24 de septiembre de 2021

Fecha límite inscripción autor principal: 8 de octubre de 2021

Fecha límite de inscripciones bonificadas: 22 de octubre 2021



# SEGURIDAD EN 5'

### El Síndrome del Trabajador Quemado gana importancia en la lista de dolencias de la OMS, y en los animalarios

(Recogemos hoy una información del diario El País, que nos sirve para reflexionar sobre los paralelismos con nuestro 'mundo animal')

### Jesús Martínez Palacio

Técnico en Prevención de Riesgos Laborales; responsable del Animalario del CIEMAT

Palabras clave: burnout, fatiga por compasión, psicosociología.

El síndrome del trabajador quemado (burnout) figurará en la próxima Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE-11) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un problema asociado al empleo o al desempleo. Una nueva clasificación que entrará en vigor en 2022.

El síndrome de desgaste emocional, como se cita en la nueva clasificación, está asociado al estrés crónico en el trabajo; caracterizado por una despersonalización de las tareas, un desgaste emocional y físico, y bajo rendimiento. Los expertos estiman que el burnout afecta al 10% de los trabajadores.

Tradicionalmente, este trastorno se asocia a trabajadores que tienen empleos relacionados con la atención a las personas, por ejemplo: médicos, enfermeras, cuidadores no profesionales o funcionarios de prisiones. "Es un proceso más que una patología, dado en personas muy comprometidas con su trabajo, que se implican. Es un proceso que suele tardar entre cinco y ocho años. Los síntomas son el desgaste emocional, el deterioro cognitivo y la indolencia y la despersonalización", sintetiza el doctor Pedro R. Gil-Monte, catedrático de Psicología Social en la Universidad de Valencia y experto en este trastorno.

Pero en nuestro gremio —la experimentación animal— también encontramos este trastorno; al fin y al cabo, somos 'cuidadores' que atendemos animales. Fundamentalmente está ligado a dos circunstancias:

- Los trabajadores que cuidan de los animales. En una modalidad muy similar al síndrome clásico ya descrito. Se tiende a cosificar a los animales y a bajar el interés y rendimiento en las tareas desarrolladas. Puede cursar incluso con 'maltrato' a los animales.
- Las personas que realizan la eutanasia de los animales. En este caso nos hemos encontrado con dos posiciones extremas:
  - La persona que automatiza las tareas y pierde totalmente la empatía y el respeto al animal.

 La persona que se vincula exageradamente con el animal y es incapaz de realizar la eutanasia. Tiene una elevada carga moral/mental y llega incluso a tener pesadillas o malestar físico cuando realiza, o prevé realizar, estas tareas.

Gil-Monte aclara que lo más común es el perfil de afectados que responden con indiferencia a su trabajo como fórmula para protegerse contra el desgaste emocional; sin embargo, apunta: "algunos desarrollan un sentimiento de culpa que los lleva a implicarse más en el trabajo y es la pescadilla que se muerde la cola. Son los que acaban con más deterioro psicológico". Sería el caso de las personas que sufren con la eutanasia, casos que deberían tratarse con el responsable laboral y podrían llevar incluso a abandonar este tipo de trabajo.

Los expertos aseguran que el cambio de la OMS ayudará a visibilizar el *burnout* y a mejorar su diagnóstico.

En España, el *burnout* no es una enfermedad profesional, pero hay sentencias que lo reconocen como un accidente de trabajo (en la modalidad 'humana'). "Queda pendiente el tema legislativo. En España hay que modificar la legislación y que se incorpore dentro de las enfermedades profesionales", apunta José Navarro, del departamento de Psicología Social de la Universidad de Barcelona.

Quizás en nuestro ámbito profesional también deberíamos visibilizar esta dolencia, porque... ¿conoces a algún cuidador que pueda presentar este cuadro clínico? Yo sí.

### Para saber más:

- Artículo original en El País: https://elpais.com/sociedad/2019/05/27/actualidad/1558956228\_933147.html
- Información del INSST: https://www.insst.es/InshtWeb/Contenidos/ Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/701a750/ntp\_704.pdf

# 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



### Técnicas de manejo no aversivo en el ratón

Violeta Solís, Concepción Mariscal, Cristina Muñoz y Magdalena Jiménez GlaxoSmithKline I+D DDW-IVSD, Tres Cantos, Madrid

Palabras clave: manejo, técnicas, ratón.

Las autoras y la mayor parte de los que estáis leyendo este texto -si no todos- hemos aprendido a manejar a ratas y ratones empezando por cogerlos de la base de la cola. Esta es la técnica que se ha venido usando durante decenas de años en todos los laboratorios. Sin embargo, hace algo más de una década, una investigadora se dio cuenta que este podría no ser el mejor de los métodos. Jane Hurst trabajaba con ratones silvestres, que deben manejarse con un túnel porque no son lo suficientemente mansos como para poder cogerlos con la mano, y observó sorprendida como los ratones de laboratorio respondían peor al manejo que lo que lo hacían los silvestres. Entonces planteó la idea de cogerlos también con un túnel y confirmó que usando esta técnica los ratones domésticos mostraban menos ansiedad y mayor interacción voluntaria con la mano humana. Hace ya 10 años que las investigadoras Jane Hurst y Rebecca West publicaron su artículo *Taming anxiety in laboratory mice*<sup>1</sup>. Artículos posteriores han confirmado sus hallazgos y la importancia de refinar el manejo, no sólo para mejorar el bienestar animal, sino también para facilitar el trabajo con los animales, así como mejorar la calidad de los resultados experimentales.

### **EL MÉTODO**

Hurst and West¹ estudiaron dos métodos alternativos a coger a los ratones por la cola, que denominaron "métodos no aversivos de manejo". Además del que ya hemos comentado del túnel, plantearon también el uso de las manos en forma de cuenco (*cuphandling*), que tiene la ventaja de no requerir material. Ambos métodos mejoraron el bienestar animal al reducir la ansiedad de los ratones y aumentaron también el tiempo de interacción voluntaria de éstos con la mano. Sin embargo, el método de túnel resultó ser más fiable, ya que los resultados positivos se reproducían de forma similar en todas las cepas y para ambos sexos. El método de las "manos en cuenco", aun siendo preferible al uso de la cola, muestra peores resultados en cepas más nerviosas como los C57BL/6 y, en algunos casos, también en machos.

El método de **manejo con un túnel** es sencillo, pero requiere tener en cuenta algunos aspectos: 1) el técnico debe tener ambas manos libres, una para sujetar el túnel y la otra para guiar al ratón hacia su interior, 2) el túnel no debe moverse, debe sujetarse junto a la pared de la jaula y guiar al ratón hacia él, 3) el túnel debe situarse junto a la pared de la jaula para aprovechar la conducta "tigmotáctica" del ratón y evitar que escape por el lado opuesto a la mano que guía, 4) tener túneles como enriquecimiento ambiental en la jaula facilita que los ratones respondan positivamente a esta técnica, porque se acostumbran y entran en ellos con mayor facilidad (ver Figura 1).

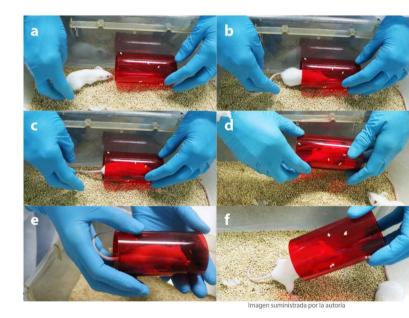


Figura 1.- Técnica para coger a los ratones con un túnel. De izquierda a derecha y de arriba abajo: secuencia de movimientos para guiar al ratón dentro del túnel, mientras se mantiene junto a la pared de la jaula (a-e). Si el ratón no quiere entrar, es preferible sujetar el túnel por la parte central. Si al entrar intenta salir por el otro lado, se puede cerrar la salida con la mano, mientras se levanta el túnel de la jaula (d). Si una vez dentro el ratón no quiere salir del túnel, es más sencillo que se deslice si se inclina el túnel dejando la cabeza del ratón hacia arriba (f). El enriquecimiento se ha retirado para una mejor visualización. Fotos: Julia Sánchez.

### **ANIMALES DE LABORATORIO**

INVIERNO 2021 / NÚMERO 88

En el caso del **manejo con las manos "en cuenco"**, la técnica es más sencilla, pero requiere mejor conocimiento de los animales para evaluar su respuesta. Se debe hacer un cuenco con las manos, como cuando vamos a coger agua de una fuente, y guiar al ratón hacia la esquina de la jaula. Una vez ahí, se deslizan las manos bajo el ratón y se le levanta de la jaula. Si está nervioso y parece que va a saltar, se pueden cerrar un poco las manos para evitarlo. Si se observa que el animal está muy nervioso debemos dejar esta técnica e intentar la del túnel, ya que el ratón puede terminar saltando de las manos desde mucha altura y hacerse daño o mordernos si las cerramos completamente, aunque esto no es frecuente (ver Figura 2).

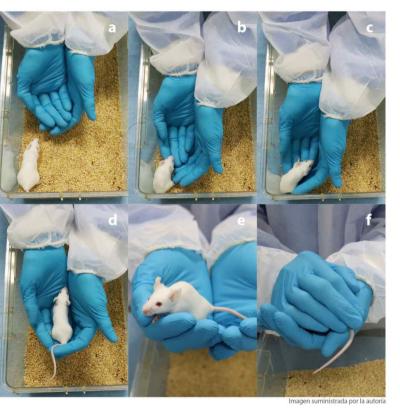


Figura 2.- Técnica para coger a los ratones con las manos en cuenco. De izquierda a derecha y de arriba abajo, secuencia de movimientos para guiar al ratón hacia la palma de la mano (a-d). El ratón se guía hacia la esquina de la jaula, donde se deslizan las manos bajo sus patas (a-c). Si al levantar las manos el ratón intenta saltar, se pueden cerrar formando una bola sobre él (f). El enriquecimiento se ha retirado para una mejor visualización.

El centro nacional británico para las 3Rs tiene una sección dedicada al manejo de los animales de laboratorio con un tutorial de menos de 20 minutos que explica de manera clara cómo se deben realizar las dos técnicas de manejo para ratón y los errores más comunes. Puede consultarse aquí: https://www.nc3rs.org.uk/mouse-handling-video-tutorial

### **MANEJOY BIENESTAR ANIMAL**

Como ya se ha mencionado brevemente más arriba, se han observado diferentes beneficios derivados de un manejo más adecuado de los animales. Para empezar, los ratones que se cogen con un túnel muestran mayor interacción voluntaria con la mano humana que los ratones que se cogen por la cola, ya desde la primera manipulación (ver Figura 3). Los ratones que se cogen en la palma de la mano también muestran un mayor tiempo de interacción voluntaria con la mano, siempre y cuando pasen por un periodo previo de habituación a este tipo de manejo. Además, los ratones manejados con los métodos no aversivos muestran menos miedo cuando se les coge, lo que se deduce porque orinan y defecan menos que los que se cogen por la cola. Este tipo de manejo reduce además la ansiedad de los ratones en pruebas de comportamiento estandarizadas, como la prueba de campo abierto y el laberinto en cruz elevado<sup>1-5</sup>. Los ratones que se manejan con el túnel muestran mayor exploración, menor frecuencia de conductas indicativas de ansiedad, menor latencia en alcanzar el centro del campo abierto y menor tiempo junto a las paredes.



Figura 3.- Prueba de interacción voluntaria de los ratones con la mano (izquierda) o con la mano y el túnel (derecha). El enriquecimiento se ha retirado para una mejor visualización. Fotos: Julia Sánchez.

#### **MANEJOY RESULTADOS EXPERIMENTALES**

Uno de los puntos a favor de los hallazgos del trabajo de Hurst and West es que demuestran que los resultados positivos del manejo con túnel o con las manos en cuenco siguen siendo válidos, aunque posteriormente se inmovilice al ratón utilizando la cola, por ejemplo, para una administración. Esto es de especial relevancia cuando vamos a realizar procedimientos con ratones, porque de nada serviría poner en marcha una nueva técnica de refinamiento si cuando vamos a realizar un procedimiento anulamos todo el trabajo anterior. Afortunadamente, no es el caso, ya que parece ser que lo realmente importante es cómo se coge al ratón para sacarlo de la jaula y no tanto las manipulaciones posteriores. Se ha observado que la interacción voluntaria de los ratones con la mano se mantiene tras realizar procedimientos y técnicas estresantes o dolorosas como la administración intraperitoneal, oral, el tatuado en la cola, o el marcaje en las orejas<sup>3,5,6</sup>.

Por otro lado, otros estudios han mostrado que este refinamiento puede mejorar los resultados experimentales al reducir el estrés y la ansiedad en los animales. Por ejemplo, las pruebas de conducta que requieran exploración, como pruebas de memoria o de discriminación de estímulos, podrían tener mejores resultados cuando los ratones se manipulan con los métodos no aversivos<sup>4</sup>. Los ratones muestran mayor interés por los refuerzos positivos, lo que muestra que estos animales tienen un mejor estado afectivo, además de poder facilitar el adiestramiento cuando se necesite que los animales realicen una tarea<sup>2</sup>. También se ha observado una menor elevación de la glucemia asociada a estrés cuando se coge a los ratones con las manos en cuenco en comparación con los que se cogen por la cola, y una mejor tolerancia a la glucosa en un modelo de obesidad inducida por la dieta. Si además se añade un "masaje", los ratones muestran también una menor elevación de la corticosterona como indicador de estrés<sup>7</sup>.

### **RESISTENCIA AL CAMBIO**

Como es habitual, cualquier cambio importante en la manera de trabajar a la que estamos acostumbrados va a llevar tiempo y esfuerzo. Este cambio en el manejo puede ser especialmente difícil para el personal que lleve más tiempo trabajando con ratones, porque está más acostumbrado a usar la cola, o cuando la carga de trabajo sea muy alta, porque es verdad que hasta que "se pille el truco" al nuevo manejo, se va a tardar más tiempo en realizar las tareas.

En el artículo de Hurst and West se requerían varios días de entrenamiento de los ratones al manejo con túnel o con las manos en cuenco. Sin embargo, en un estudio posterior⁵ mostraron que, con realizar una única manipulación de 2 segundos con el túnel durante el cambio de jaula, ya se observaba un efecto positivo de este tipo de manejo. En el caso de las manos en cuenco sí que se necesitaban varias sesiones para acostumbrar a los animales, pero lo que es especialmente llamativo es que observaron que una única manipulación del ratón por la cola durante 2 segundos era suficiente para producir rechazo a la mano humana. Además, evaluaron si los ratones se dejaban coger con mayor o menor facilidad según el tipo de manejo y observaron que los que más fácilmente se cogían eran los manipulados con un túnel, mientras que los que más evitaban la captura eran los manipulados por la cola. Es decir, que la mejora en el manejo no sólo beneficia a los ratones, también a nosotros, porque nos puede resultar más sencillo trabajar con ellos utilizando estos métodos.

John Waters es un técnico de laboratorio que ha investigado las barreras a la implementación de estos métodos en los centros de investigación, por lo que ha recibido varios premios<sup>8</sup>. En su trabajo concluye que no se necesita más tiempo para trabajar utilizando los métodos de manejo no aversivos, una vez superado el periodo de aprendizaje. En la página web del Centro Nacional Británico para las 3Rs han publicado recientemente testimonios de varios técnicos que lo han puesto en marcha y todos coinciden en que no se tarda más en realizar el trabajo, una vez superado el periodo de formación, y que se han reducido los mordiscos de los ratones utilizando estos refinamientos en el manejo. Se pueden ver aquí: https://www.nc3rs.org.uk/non-aversive-mouse-handling-practice

### **NUESTRA EXPERIENCIA**

Hemos estado haciendo una serie de pruebas para implementar el uso del túnel en nuestro centro<sup>a</sup>. Lo primero que hicimos fue intentar replicar el estudio original. Únicamente probamos el manejo con túnel, pero realizamos además un estudio de farmacocinética (PK) para ver si el estrés de la manipulación en este tipo de ensayo revertía el efecto positivo del manejo con túnel o no, especialmente porque nos preocupaba que, al meter a los ratones en los cepos para coger las muestras de sangre de cola, pudieran asociar el túnel del cepo con algo negativo y generalizarlo a cualquier tipo de túnel. Al igual que en el estudio de Hurst and West<sup>1</sup>, observamos un aumento en el tiempo de interacción voluntaria en los ratones que se cogían con el túnel, aunque en nuestro caso, el tiempo de interacción

 a. Todos los estudios con animales pasaron por un proceso de revisión ética y se realizaron de acuerdo con la Directiva Europea 63/2010 y con la política de GSK sobre el cuidado, bienestar y trato ético de los animales.

### **ANIMALES DE LABORATORIO**

INVIERNO 2021 / NÚMERO 88

voluntaria de los ratones que se cogían por la cola fue bastante superior al del artículo original. Pensamos que esto puede ser porque los solemos coger más hacia la base y los apoyamos en la mano rápidamente, por lo que pasan poco tiempo en el aire. Sin embargo, lo que fue más interesante, es que tras hacer el estudio de PK, no observamos una reducción del tiempo de interacción voluntaria en los ratones que se cogieron con un túnel, pero sí en los ratones que se cogieron por la cola, siendo esta diferencia significativa entre los dos grupos. Por tanto, podríamos concluir que para los ratones que cogemos por la cola, el estudio de PK ha resultado ser más estresante que para los animales que hemos cogido con el túnel.

La segunda prueba que hicimos fue poner directamente los túneles en las jaulas de los animales de una habitación y realizar el cambio con el túnel. Observamos que, al tener el túnel en la jaula, los ratones se acostumbraban a él y en una sola sesión de entrenamiento ya se manejaban bien con túnel. Confirmamos que el tiempo necesario para realizar el cambio de jaula no aumenta, entre otras cosas porque al abrir la jaula los ratones se meten en el túnel para esconderse y se pueden pasar directamente a la jaula limpia. En este caso, utilizamos túneles comerciales transparentes para facilitar la observación de los animales. Sin embargo, la opinión del personal que se encarga del cuidado de los animales fue que la observación era mejor poniendo al animal en la palma de la mano, en vez de a través del túnel.

Además, ahora estamos empezando a utilizar los túneles a la llegada de los animales, para pasarlos de la caja de transporte a la jaula donde se van a alojar. De esta manera, facilitamos que se acostumbren a este manejo y que pierdan el miedo a la mano humana desde el primer día en el centro.

### CONCLUSIONES

Como hemos visto, el manejo de ratones mediante técnicas no aversivas mejora el bienestar animal, facilita el trabajo con los animales y puede mejorar la calidad de la ciencia.

Por ello, actualmente estamos en proceso de implementar el uso de túneles con los animales de experimentación de nuestro centro. Hemos comprado túneles transparentes para poner en todas las jaulas y hemos realizado un curso teórico-práctico para el personal que trabaja con animales. Lo hemos probado con algunos de los ratones que están en los aisladores e incluso parece que en esas condiciones va a poder ser posible utilizar los túneles. Esperamos implementar estos nuevos sistemas de manejo poco a poco y en un tiempo poder utilizarlos con todos los animales del centro.

#### **BIBLIOGRAFÍA**

- 1. Hurst J.L. and West R.S. *Taming anxiety in laboratory mice*. Nature Methods. 2010;7(10):825-6.
- 2. Clarkson J.M., Dwyer D.M., Flecknell P.A., et al. Handling method alters the hedonic value of reward in laboratory mice. Scientific Reports. 2018;8:2448.
- 3. Nakamura Y. and Suzuki K. *Tunnel use facilitates handling of ICR mice and decreases experimental variation*. Journal of Veterinary Medical Science. 2018;80(6):886-92.
- 4. Gouveia K. and Hurst J.L. *Optimising reliability of mouse performance in behavioural testing: the major role of non-aversive handling.* Scientific Reports. 2017;7:44999.
- Gouveia K. and Hurst J.L. Improving the practicality of using non-aversive handling methods to reduce background stress and anxiety in laboratory mice handling can stimulate stress and anxiety in laboratory. Scientific Reports. 2019;9:20305.
- Roughan J.V. and Sevenoaks T. Welfare and scientific considerations of tattooing and ear tagging for mouse identification. JAALAS. 2019;58(2):142-53.
- 7. Ghosal S., Nunley A., Mahbod P., et al. Mouse handling limits the impact of stress on metabolic endpoints. Physiology & Behavior. 2015;150:31-7.
- 8. Waters J. Time for change? Practicalities of implementing non-aversive methods for handling mice. IAT Journal. 2017;16(1):47-56.



### 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









AFETY.

CUSTOM DIETS

BEDDING

ENRICHMENT

DIETS

### **ANIMALES DE LABORATORIO**

INVIERNO 2021 / NÚMERO 88

# ExpoBioterios Virtual 2020. Organizar un evento virtual sin renunciar a nada

Juan Manuel Baamonde<sup>1</sup> y Hernán Serna Duque<sup>2</sup> 
<sup>1</sup>Bioterios.com
<sup>2</sup>BINAFX SI U/SAS

Palabras clave: congreso, virtual, ExpoBioterios.



Figura 1.- Portada de la página web del congreso ExpoBioterios Virtual.

### CAPÍTULO UNO: PÚBLICO OBJETIVO

El primer paso para organizar un congreso virtual es captar a tu público objetivo. En el caso de ExpoBioterios Virtual (EBV), lo que hicimos fue establecer una segmentación; es decir, pensamos que debería ir no sólo dirigido a responsables de Bioterios, sino a todo el personal relacionado con la experimentación animal dentro de un centro de investigación. Para afinar esta segmentación se necesita una página web; ésta puede ser muy sencilla conteniendo lo necesario para registrarse, o una algo más completa y corporativa como la que se diseñó para EBV (ver Figura 1). En cualquier caso, la web debe incluir como mínimo los siguientes elementos:

- Fecha del congreso: importante tenerla definida para cuando se lance la web; esta fecha ya no debería sufrir ningún cambio.
- Programa científico: lo más definido posible y abarcando temas que refuercen la segmentación que se ha planteado para el publico objetivo.
- Formulario de registro: éste será el método por el que los visitantes podrán inscribirse al evento. Debe tener la información clave obligatoria para poder generar los registros y claves de acceso. En el caso de EBV, el formulario de registro tenía otros apartados necesarios para la valoración de intereses de cara al futuro ExpoBioterios Virtual 2021.

- Pasarela de pagos: es imprescindible contar con un sistema de pago en el caso que el evento requiera pagar algún ítem (como la inscripción al congreso). Esto depende mucho del país o región donde se tenga previsto el desarrollo técnico de la plataforma. Lo normal es habilitar el pago con tarjeta o transferencia bancaria. En EBV, se utilizó PayPal como pasarela de pago.

### CAPÍTULO DOS: TEMÁTICA DEL EVENTO

En la medida de lo posible, se debe organizar un comité científico con la suficiente experiencia para poder desarrollar el programa científico. En el caso de EBV, no se dispuso del tiempo deseado para conformar este comité; con lo que se echó mano de

la experiencia y buen hacer de los organizadores. De cualquier forma, se deben tener en cuenta los siguientes ítems:

- Programa científico: debe incluir información clara y precisa acerca de la temática general del evento; en EBV fueron las 3Rs.
- **Fechas y horario:** describir claramente cuáles son los días de celebración del congreso y el horario de éste.
- Ponentes: importante añadir una sección que incluya su nombre, *Curriculum vitae* con foto, temática de su ponencia, fecha y hora de esta. Todo ello ayudará a generar confianza en los posibles asistentes al congreso (ver Figura 2).



Figura 2.- Ponentes del EBV 2020.

caso de necesitar traducciones –como fue el caso de EBV– la mejor opción es grabar con antelación.

En este punto es importante pensar en las estrategias de captación de asistentes. En EBV se diseñó un plan de marketing activo basado en campañas publicitarias en redes sociales. Aquí vuelve a tomar protagonismo contar con una página web corporativa que será el punto de aterrizaje para los interesados en asistir al congreso.

Para la emisión en directo hay múltiples alternativas como Youtube, Zoom o Google Meet (de pago). En este caso, los usuarios se conectan a través del enlace que se les envía con antelación o directamente por la plataforma del congreso como se hizo en EBV.

#### CAPÍTULO TRES: PONENCIAS Y DETALLES

La tecnología de la información se presenta como un aliado fundamental para el desarrollo de un congreso virtual. En este sentido, y al gusto del consumidor, hay decenas de posibilidades y detalles técnicos para adornar la plataforma. La plataforma de EBV

Hay dos alternativas para el desarrollo de las ponencias: grabarlas con antelación o emitirlas en directo. Si se graban previamente, únicamente hay que subirlas a cualquier plataforma de vídeo como Youtube o Vimeo, e insertar los vídeos en la web del congreso. En el

### **ANIMALES DE LABORATORIO**

INVIERNO 2021 / NÚMERO 88

dispuso de muro social, sección de *Networking*, notificaciones al instante, información del *sponsor*, zona de pósteres científicos y la App de ExpoBioterios Virtual.

#### CAPITULO CUATRO: ZONA COMERCIAL

Los congresos virtuales pueden (o no) tener zona comercial. En caso de tenerla, lo recomendable es que sea una zona de fácil acceso y ejecución. Durante EBV se decidió tener dos pabellones con 19 stands para patrocinadores en cada uno de ellos (ver Figuras 3 y 4). La puesta en escena de los stands también puede variar y se puede ejecutar dependiendo del gasto que se quiera asumir. En EBV se decidió desarrollar los stands con todos los elementos que tecnológicamente teníamos a mano:

 Tipos de stands: puede haber varios tipos dependiendo de la categoría del patrocinador. En el caso de EBV había stands tipo básico, VIP o Premium. Esto es clave a la hora de definir las categorías de los posibles patrocinadores y sus posibilidades comerciales.

- Stands interactivos: ayuda mucho que "el visitante virtual" pueda visualizar de diferentes maneras el objetivo comercial o informativo del stand como links interactivos, fotos, banners, videos y trivias; los elementos que se aplicaron en los pabellones comerciales en EBV.
- Comunicación: los stands deben contar con sistemas de participación, como videollamadas y chat para facilitar la comunicación entre asistentes y patrocinadores. EBV desarrolló además un sistema de reconocimiento/entrada que consistía en una notificación del patrocinador una vez que el congresista entraba a visitar el stand, pudiendo así comenzar una conversación.

Llegados a este punto, si un congreso virtual cuenta con patrocinadores (que es lo normal), estos deben incluirse en la web del evento. Contar con el respaldo de empresas comerciales del sector es otro elemento de diferenciación que genera confianza.



Figura 3.- Pabellón "Amazonia".



Figura 4.- Pabellón "Los Andes".

### **FINAL DEL CONGRESO**

Una vez terminado el congreso... ¿termina el trabajo? Pues no; una buena participación asegura el trabajo post-congreso.

En el caso de EBV hubo multitud de *hot leads*; es decir, contactos interesados en la temática del congreso virtual, la zona comercial y cómo se había desarrollado la plataforma en general. Además, hubo un sin número de mensajes de felicitaciones y reconocimientos que por supuesto todos recibieron respuesta, sin dejar a un lado los anhelados certificados de asistencia.

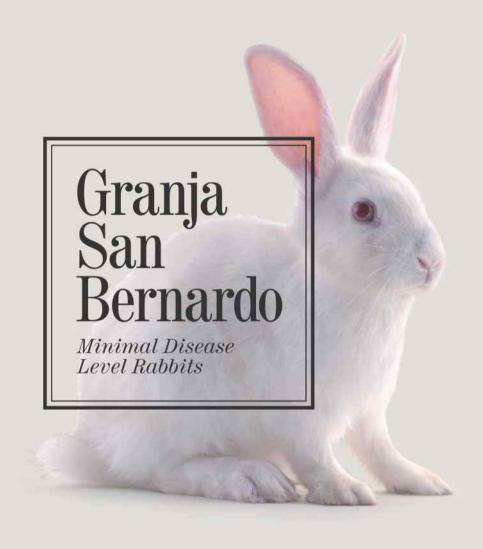
El congreso virtual es una alternativa al congreso presencial que permite reducir costes y maximizar la difusión, llegando a todos los "asistentes virtuales" independientemente de su localización geográfica.

Un congreso virtual tiene, entre otras ventajas:

- Aumentar la asistencia.
- Incrementar la difusión del congreso.
- Acceso a un número más amplio de usuarios.

### **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos a todos los que de alguna manera pusieron su granito de arena en el desarrollo de EVB: familia, amigos, colegas, equipo técnico, y muy especialmente al Dr. Marcel Perret-Gentil, la Dra. Luisa María Macedo, Natalia Arbeláez y Rodrigo Vargas.



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

# ¿Y TÚ, QUÉ OPINAS?

# Reproduciendo la sepsis: la importancia del "detalle"

Rafael Alayón<sup>1,2</sup> y Víctor A. Armendáriz<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Universitario de Salud Animal y Seguridad Alimentaria, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria <sup>2</sup>Servicio Experimentación Animal, Unidad de Investigación Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Nearín

Palabras clave: sepsis, laparotomía, ligadura.

En los últimos años, se ha visto la necesidad imperante de investigar más en profundidad los procesos sépticos debido a su complejidad y a la elevada mortalidad que causan. Está descrito que el abdomen es el principal foco de los procesos sépticos, estando relacionado con una alta morbilidad y mortalidad¹. Para estudiar los mecanismos de acción de los procesos sépticos es fundamental tener modelos animales de sepsis fiables, como la ligadura y punción cecal (CLP) que se considera el procedimiento experimental de referencia a la hora de recrear modelos sépticos en animales².

Se conoce que la sospecha y la detección de bacteriemia tiene un importante significado diagnóstico y pronóstico, que obliga en ocasiones a cambiar algunas de las pautas establecidas en los pacientes que la sufren³. Existen algunos biomarcadores de sepsis descritos como: la Proteína C Reactiva, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL6, IL12 y otras citoquinas, en la respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), que pueden ayudar al diagnóstico precoz de procesos sépticos.

Con el fin de estudiar la potencialidad terapéutica de nuevas moléculas antimicrobianas, así como su interacción con los biomarcadores mediadores de la respuesta inflamatoria sistémica de la sepsis, se diseñó un modelo experimental en ratas macho de la cepa Sprague Dawley de 12 semanas de edad. El diseño consistía en usar 12 individuos (n=12) divididos en dos grupos, AGU1 (n=6) y AGU2 (n=6) para realizar la ligadura y punción cecal tal y como está descrita por algunos autores⁴. Tras 20 horas desde la CLP, se procedió a realizar una necropsia reglada para la toma -por duplicado- de muestras de los individuos supervivientes: sangre, orina, fluido del lavado peritoneal (PLF), hígado, bazo, riñón, duodeno, páncreas, yeyuno, raíz mesentérica, timo, fluido del lavado broncoalveolar (BALF), pulmón y corazón. Para su análisis se realizaron estudios citológicos, microbiológicos, anatomopatológicos, bioquímicos, de expresión génica y proteómica.

Los primeros resultados obtenidos presentaban diferencias marginalmente significativas en los siguientes parámetros: leucocitos totales, células nucleadas presentes en el lavado broncoalveolar y peritoneal (BALF y PLF, respectivamente), y número de animales con bacteriemia confirmada por hemocultivo positivo (ver Tabla 1). Este hallazgo no era de esperar, puesto que ambos grupos estaban formados por individuos de la misma edad, sexo y cepa que habían cohabitado en la misma sala del animalario y habían recibido el mismo alimento.

**Tabla1.**-Principales variables (hematológicas, citológicas y microbiológicas) con cambios observados entre grupos. Resultados expresados como medianas (P25-P75) de ratas del grupo 1 y grupo 2. *TNC BALF*: Concentración de células totales nucleadas en fluido procedente de lavado broncoalveolar; *TNC PLF*: Concentración de células totales nucleadas en fluido procedente de lavado peritoneal. Se ha utilizado el test no paramétrico de la U-Mann-Whitney para la comparación entre grupos. p-valor <0,05 se considera para significancia estadística entre grupos.

	Leucocitos	TNC BALF	TNC PLF	Bacteriemia
	(10³/μl)	(10³/µl)	(10³/μl)	(n)
Grupo 1	4,07	0,16	0,8	_
(n=6)	(3,1-5,89)	(0,05-0,28)	(0,76-2,5)	3
Grupo 2	1,53	0,37	2,52	_
(n=6)	(0,89-2,67)	(0,15-0,72)	(1,3-3,2)	6
	p (0,059)	p (0,052)	p (0,059)	p (<0,05)

En el grupo AGU1, teniendo en cuenta los parámetros propios de una rata séptica reflejados en la bibliografía, se confirmaba que la ligadura y punción cecal había tenido el efecto esperado. Sin embargo, a la hora de analizar los resultados obtenidos en el grupo AGU2, aunque los recuentos leucocitarios eran superiores

# ¿Y TÚ, QUÉ OPINAS?

### **ANIMALES DE LABORATORIO**

INVIERNO 2021 / NÚMERO 88

en comparación con los de un individuo sano, no llegaban a los valores propios de los procesos sépticos. Concluyendo, finalmente, que las diferencias encontradas suponían un error del diseño experimental.

¿Y tú qué opinas?

¿Qué ha podido ocurrir?

¿Se han seguido los protocolos de manera rigurosa?

¿El material usado estaba en correcto estado?

### ¿Propondrías cambios en el diseño experimental?

En busca del error, se decidió realizar una meticulosa recreación en paralelo del protocolo llevado a cabo por los investigadores del grupo, siguiendo una técnica ya descrita en otros estudios<sup>4</sup>. En el proceso se realiza una laparatomía en la que se expone el ciego, se liga un segmento distal a la válvula ileocecal y se perfora el borde antimesentérico con una aguja de calibre 20G (ver Figura 1).

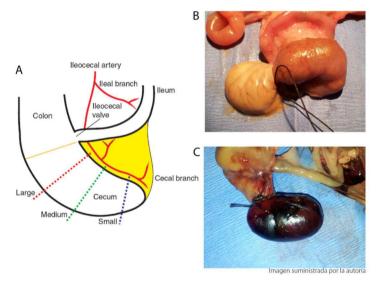


Figura 1.- A. Esquema de los diferentes lugares para ligar el ciego con la finalidad de lograr grados de severidad infecciosa leve, media o alta (líneas discontinuas azul, verde o roja, respectivamente). Extraído de Rittirsch D. et al. (2009). B. Detalle de la ligadura en el ciego en la necropsia de un animal del grupo AGU2. C. Detalle de la ligadura en el ciego en la necropsia de un animal del grupo AGU1. Obsérvese la diferencia de longitud de la sutura empleada como cuerpo extraño, en ambos animales.

Tras la recreación, se observó que el investigador encargado de la CLP del grupo AGU1 usó una sutura de seda multifilamento (Silkam) para la ligadura, dejando 5 cm sobrantes de la misma en la cavidad abdominal, mientras que en el grupo AGU2 se realizó igual, pero dejando únicamente 2 cm de sutura de seda Silkam. Cabe destacar que, por motivos de fuerza mayor, cada grupo fue operado por un investigador diferente.

Considerando esta diferencia como la causante de la disparidad en los resultados entre ambos grupos, podemos proponer una explicación lógica. Silkam es una seda formada por múltiples filamentos entrelazados que, sumado al fragmento de 5 cm, conlleva una mayor superficie de "cuerpo extraño" para que las bacterias comensales del colon puedan: proliferar, invadir la cavidad peritoneal e inducir un posterior estado séptico en menor tiempo y mayor eficacia. Este hecho indica que la diferencia de tamaño del cuerpo extraño produce marcadas diferencias en los resultados obtenidos, teniendo que ser rigurosos en este aspecto como está descrito por algunos autores<sup>5</sup>.

Por tanto, con el fin de alcanzar el estado séptico en el tiempo planteado durante la realización de los próximos protocolos de CLP, se propone el uso de una seda multifilamento, dejando 5 cm sobrantes de la misma dentro del peritoneo.

### **BIBLIOGRAFÍA**

- Hecker A., Reichert M., Reub C.J., et al. Intra-abdominal sepsis: new definitions and current clinical standards. Langenbeck's Archives of Surgery. 2019;404(3):257-71.
- 2. Buras J.A., Holzmann B., and Sitkovsky M. *Animal models of sepsis:* setting the stage. Nature reviews. Drug discovery. 2005;4(10):854-65.
- Julián-Jiménez A., Candel F.J., and González-Del Castillo J. Utilidad de los biomarcadores para predecir bacteriemia en pacientes con infección en urgencias. Revista Espanola de Quimioterapia. 2017;30(4):245-56.
- Rittirsch D., Hubber-Lang M.S., and Flierl M.A. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. Nature protocols. 2009;4(1):31-6.
- Ruiz-Bravo López A. and Avilés Martín P. Procedimientos experimentales en farmacología y toxicología. En: Ciencia y Tecnología en Protección y Experimentación Animal McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U, Madrid, pp 513-28. 2001.

# Cuando una puerta se cierra, otra se abre para compensar

María Luisa Cayuela Fuentes<sup>1,3</sup>, Diana García Moreno<sup>2,3</sup>, Francisca Alcaraz Pérez<sup>1,3</sup>, Jesús García Castillo<sup>1,3</sup> y Victoriano Mulero Méndez<sup>2,3</sup>

<sup>¹</sup>Grupo Telomerasa, Cáncer y Envejecimiento, IMIB-Arrixaca <sup>²</sup>Grupo Inmunidad, Inflamación y Cáncer, UMU/IMIB-Arrixaca <sup>²</sup>CIBER-ER, ISCIII

Palabras clave: compensación génica, pez cebra, knock out.

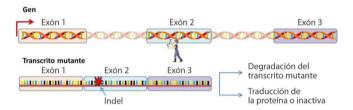
### INTRODUCCIÓN

Los investigadores recurrimos a modelos *in vitro* o *in vivo* para entender los mecanismos implicados en un proceso biológico o una enfermedad. Esta tarea ha sido enormemente facilitada gracias al desarrollo de las herramientas de edición genética CRISPR/Cas9, cuya aplicación les ha valido el merecido premio Nobel 2020 de Química a Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna. Sin embargo, no podemos evitar sentir decepción al ver que estos prestigiosos premios no han considerado los trabajos esenciales de ciencia básica realizados por Francis Mojica, en los que se apoyaron las dos recién estrenadas nobeles. Una pena.

Volviendo a las maravillosas herramientas moleculares CRISPR/Cas9, que permiten la edición genética a la carta, éstas han supuesto una revolución, facilitando enormemente la obtención de modelos deficientes en un gen (knock-out, KO) de forma relativamente sencilla y muy eficaz.

La gran cantidad de organismos generados por manipulación genética ha permitido poner de manifiesto un hecho curioso, y es el alto número de modelos deficientes en un gen (KO) que no tienen el fenotipo previamente identificado en experimentos de disminución del transcrito (knock-down, KD), donde se han utilizado otras herramientas como oligonucleótidos antisentido o morfolinos (ver Figura 1).

### Modelo de deficiencia en un gen (Knock-out)



### Modelo de disminución del transcrito (Knock-down)

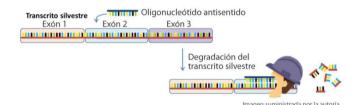


Figura 1.- Modelos deficientes en un gen (knock-out) y de disminución del transcrito (knock-down). En los modelos deficientes en un gen, se genera, mediante el sistema CRISPR-Cas9, un indel (pequeñas deleciones o inserciones) a nivel genómico. Esta mutación da lugar a un transcrito mutante que puede ser reconocido y degradado por la maguinaria celular, o bien da lugar a la síntesis de una proteína truncada o inactiva. En los modelos de disminución del transcrito se actúa a nivel de mRNA, sin modificar el genoma, diseñando un oligonucleótido antisentido que hibridará por complementariedad de bases con una parte de la secuencia del transcrito silvestre. Este apareamiento de bases será detectado por la maquinaria celular y degradará el transcrito silvestre señalado. Ambos modelos producen una disminución parcial o total de la cantidad de la proteína presente en la célula. Los modelos de disminución del transcrito (knock-down) suelen ser modelos transitorios, durando el efecto el tiempo que esté presente el oligonucleótido en la célula, mientras que en los modelos de deficiencia de un gen (knock-out), al editarse el genoma, su efecto se hereda y por tanto no es transitorio.

### **ANIMALES DE LABORATORIO**

INVIERNO 2021 / NÚMERO 88

Este hecho sorprendente, en el que la mutación del gen, normalmente provocada por la presencia de un codón de terminación prematuro (PTC), tiene menos efecto que cuando se disminuye su expresión, no fue bien entendido al principio. Se argumentó por efectos de inespecificidad (*target-off*) de las herramientas para hacer KD o por una posible naturaleza hipomórfica de los alelos mutantes generados.

Sin embargo, descubrimientos recientes han revelado otro posible mecanismo molecular que explica las diferencias observadas en los fenotipos entre un KD y KO para el mismo gen. Este proceso ha sido llamado compensación génica.

El fenómeno de compensación génica ha sido observado en muchos modelos como Arabidopsis, ratón, Drosophila, pez cebra y líneas celulares humanas sugiriendo, por tanto, que debe ser un mecanismo conservado evolutivamente entre organismos superiores<sup>1</sup>.

La compensación génica se explica por la redundancia que hay en el genoma, que permitiría compensar la falta de expresión de un gen concreto por otro, normalmente un parálogo (derivado de la duplicación génica entre las especies) o un no-parálogo (que comparte dominios funcionales o que se encuentra en la misma ruta que el gen inactivado o mutado).

Precisamente esa redundancia ha hecho del pez cebra un modelo ideal para estudiar la compensación génica, ya que duplicó su genoma una vez más que el resto de los vertebrados millones de años atrás. Y, lo que era una desventaja para los investigadores que se veían obligados a tener en cuenta la duplicación a la hora de inactivar un gen o estudiar la función, se ha convertido en una ventaja para estudiar el efecto de compensación génica.

### EL PEZ CEBRA Y LA COMPENSACIÓN GÉNICA

El modelo de pez cebra, por su rápido desarrollo extrauterino, permite la fácil manipulación genética por microinyección de herramientas como CRISPR/Cas9, RNA mensajeros (mRNA) y morfolinos. Los morfolinos son oligonucleótidos antisentido modificados químicamente que impiden la traducción del mRNA, generándose modelos por KD.

Comparando los fenotipos de los modelos en pez cebra KO y KD se encontraron que, de 26 genes, sólo el 20% de los KO recapitulaba de forma precisa los fenotipos de los KD. En algunos casos, estas discrepancias eran probablemente debidas a la

inespecificidad, esto es, una secuencia similar a la del morfolino presente en otros genes que produciría que el morfolino disminuyera la expresión de estos.

Sin embargo, no era siempre el caso, como pudo observarse con la línea de pez cebra deficiente en el gen egfl7 (codifica una proteína de la matriz extracelular altamente expresada en células endoteliales) que tiene un fenotipo menos severo que el producido cuando se disminuye la expresión de su mRNA. En este modelo se observaron los siguientes hechos importantes: i) la microinyección del morfolino en el modelo deficiente en egfl7 no exacerbaba el fenotipo, descartando su efecto en cualquier otro gen; ii) se detectó en la línea KO, pero no en la KD, la sobreexpresión de genes con dominios parecidos a egfl7 (emilin 2a, emilin 3a y emilin 3b); iii) la microinyección de mRNA de estos parálogos emilin 2 y emilin 3 rescató el fenotipo en el modelo de KD de eglf7².

Observaciones similares han sido realizadas para otros genes<sup>3,4</sup>, lo que sugiere que, en el contexto de la presencia de una mutación, se compensa el fenotipo sobreexpresando genes que pueden desarrollar una función parecida. Este mecanismo no es activado cuando la expresión de ese gen es bloqueada a nivel post transcripcional, como ocurre en los modelos KD.

### OTROS EJEMPLOS EN MODELOS DE RATÓN

Los mamíferos no tienen tantas opciones como el pez cebra para la compensación génica, ya que para la mayoría de genes sólo tienen una copia. Sin embargo, están bien documentadas las discrepancias entre los fenotipos KD y KO donde, de igual manera, los modelos KD tienen un fenotipo más severo comparado con los KO<sup>5</sup>.

Utilizando pequeños RNAs interferentes en células madre embrionarias de ratón para la eliminación de TET1, una enzima que convierte la 5-metilcitosina (5mC) en 5 hidroximetilcitosina (5hmC), se provoca una reducción en los niveles de 5hmC y la pérdida de la morfología típica de células indiferenciadas. Sin embargo, el mutante Tet1 sólo presentó una disminución ligera de 5hmC y presentaba un fenotipo indiferenciado típico de célula madre, siendo propuesto un mecanismo de compensación ejercido por la enzima estrechamente relacionada TET2<sup>6</sup>.

En algunos casos el mecanismo ha sido identificado debido a la regulación de la expresión de otros genes relacionados. Por ejemplo, la pérdida en ratón del gen ribosomal Rpl22 no muestra defectos en la traducción. En este modelo se comprobó la

sobreexpresión compensatoria de Rpl22l1, un gen parálogo. La expresión de Rpl22l1 es normalmente inhibida por la proteína RPL22<sup>7</sup>. Pero no en todos los casos se ha encontrado una relación tan directa. A veces los mecanismos compensatorios pueden involucrar funciones de proteínas que están más arriba de la ruta afectada.

### MECANISMOS MOLECULARES DE LA COMPENSACIÓN GÉNICA

Al igual que un buen cocinero hace un buen plato, aunque le falte un ingrediente, y al degustador le parece un plato igualmente delicioso, los organismos son capaces de compensar la deficiencia de un gen y no presentar un fenotipo deletéreo. Este fenómeno se conoce como robustez genética y su resultado es la supervivencia.

Se han lanzado varios modelos sobre el mecanismo de este apasionante proceso. Recientemente, se han publicado dos estudios donde se han identificado 8 genes de pez cebra y 4 de ratón (ver Tabla 1) que, cuando son mutados, disparan el mecanismo de compensación génica<sup>1,4</sup>.

**Tabla 1.-**Modelos utilizados donde se observan discrepancias entre modelos KO y KD. Genes compensadores propuestos.

Modelo	Gen mutado	Gen compensador propuesto
Pez cebra	hbegfa	hbegfb
Pez cebra	vcla	vclb
Pez cebra	hif1ab	epas1a y epas1b
Pez cebra	vegfaa	vegfab
Pez cebra	egfl7	emilin3a
Pez cebra	alcama	alcamb
Pez cebra	capn3a	capn8 y capn12
Pez cebra	nid1a	nid1b y nid2a²
Ratón	Fermt2	Fermt1
Ratón	Rela	Rel
Ratón	Actg1	Actg2
Ratón	Actb	Actg1

Estos investigadores, a raíz de los resultados, han propuesto un modelo en el cual un mRNA portador de una mutación, como puede ser la adquisición de un codón prematuro de terminación (PTC), dispara la transcripción de genes compensadores. Lo hace activando una ruta llamada "degradación del RNA mensajero mediada por mutaciones terminadoras" (NMD, del inglés Nonsense Mediated Decay). NMD es un mecanismo de control de calidad del mRNA que impide la traducción de transcritos que han sido incorrectamente procesados durante la transcripción, pero también reduce la traducción de transcritos de genes que portan una mutación como puede ser un PTC.

El modelo propone que los mRNA con un PTC o mal procesados son dianas de NMD que los degrada, produciendo pequeños fragmentos de RNA que contienen secuencias similares a los genes compensadores. Estos fragmentos de RNA son transportados al núcleo y allí producen la sobreexpresión de los genes compensadores por dos posibles vías, o bien remodelando la cromatina en una conformación abierta que permite la transcripción, o bien secuestrando represores de RNA antisentido (ver Figura 2).

### Compensación génica

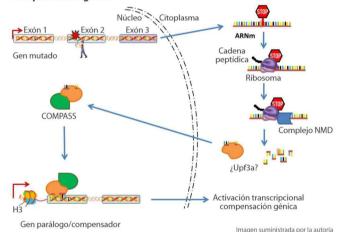


Figura 2.- Mecanismo propuesto para inducir la compensación génica. Al generar una mutación en el DNA genómico mediante técnicas de edición del genoma, se suele generar un codón de terminación prematuro (PTC). La molécula de mRNA portadora de la mutación una vez en el citoplasma será traducida por los ribosomas que al llegar al PTC, activará la maquinaría de control de calidad de mRNAs, el complejo NMD. Este complejo degrada el mRNA mutado. Los fragmentos generados son llevados al núcleo, posiblemente utilizando a la proteína Upf3a como vehículo, donde se une a COMPASS. COMPASS es un complejo proteico que favorece la transcripción a través de la modificación de las Histonas (H3). El complejo es dirigido hacia los genes parálogos por la complementariedad que presentan con los pequeños fragmentos del mRNA degradado. Una vez unido al gen parálogo modificará el estado de la cromatina en la región promotora induciendo la expresión del gen. Obrero con martillo y cincel: representa la técnica de edición del genoma. Flecha roja: representa una región promotora. H3: histona 3. Estrella roja: indel (inserción/deleción).

### **ANIMALES DE LABORATORIO**

INVIERNO 2021 / NÚMERO 88

El modelo se basa en varias evidencias experimentales. La primera de ella es que los transcritos de gen mutante (KO) son poco abundantes, sugiriendo que son inestables. Curiosamente, cuando se bloquea el NMD (eliminando el factor principal del complejo, la proteína UPF1) se produce un incremento en la cantidad del mRNA mutante y se reduce la sobreexpresión de los genes compensadores. Es decir, se necesita la degradación del mRNA mutante por NMD.

Por otro lado, la activación de NMD en peces o líneas celulares de ratones silvestres introduciendo, bien por microinyección o bien por transfección, un mRNA inmaduro (sin caperuza en la posición 5'), induce la expresión de genes compensadores. Sin embargo, si se introduce un RNA maduro estable, no se produce la expresión de genes compensadores, demostrando la importancia de NMD para activar la compensación génica.

Además, en la mayoría de los genes probados tanto en líneas celulares de ratón como en pez cebra, no se observaron fenómenos de compensación génica al delecionar completamente el gen (es decir, sin generación de transcrito). Sin embargo, la deleción completa del egfl7, activaba la compensación génica, pero en menor medida que cuando había un transcrito con un PTC<sup>3</sup>. Ma et al. muestran que algunos genes con PTC no eran capaces de activar NMD y cuando esto ocurría no se observaba el fenómeno de compensación génica, reforzando la importancia de NMD para activar la compensación génica, pero revelando la existencia de otros mecanismos desconocidos que están participando.

Finalmente, se vio un incremento en la transcripción de genes que están relacionados ancestralmente con el gen mutado. El incremento de la transcripción de los genes parálogos fue acompañado por modificaciones epigenéticas en las regiones promotoras –trimetilación de la lisina 4 de la Histona 3 (H3K4m3), marca de activación transcripcional – que producían cambios en la estructura de la cromatina haciéndola accesible a los factores de transcripción. Los dos grupos de investigadores encontraron que el mecanismo de compensación génica depende de un complejo proteico llamado COMPASS, el cual facilita la trimetilación de la Histona 3 (H3K4m3), favoreciendo de este modo la expresión de los genes.

Pero ¿cómo la eliminación específica de un mRNA por NMD dispara la sobreexpresión de genes similares y no de otros genes? Se ha propuesto que proteínas unidas a los fragmentos de mRNA

sean los medios de transporte que los lleven al núcleo, donde se unirían a secuencias complementarias de los genes parálogos. Ese factor podría ser la proteína UPF3, que forma parte del complejo NMD y que interacciona con el complejo COMPASS. UPF3 guiaría al complejo COMPASS al gen parálogo, y éste modificaría la conformación de la cromatina, activando la transcripción (ver Figura 2).

### CÓMO DEBEN HACERSE LOS MODELOS

Con estos nuevos descubrimientos, queda preguntarnos cómo estamos interpretando en el laboratorio los fenotipos y los cambios transcripcionales que observamos en los modelos deficientes en un gen (KO) con respecto a un silvestre. Los mecanismos de compensación descritos deben ser tenidos en cuenta sobre todo a la hora de hacer modelos de enfermedades humanas.

Por tanto, en la generación de modelos es importante hacer mutantes que no disparen el mecanismo de compensación génica para evitar que los defectos biológicos sean enmascarados.

Para evitar, o al menos minimizar, la compensación génica sería recomendable generar alelos mutantes sin producción de mRNA, es decir, alelos que no tengan promotor o incluso la deleción completa del locus. Sin embargo, antes de realizar estas modificaciones extremas del genoma primero se debe estar seguro (hasta donde nuestro conocimiento nos permita), que no haya RNA largos no codificantes o elementos reguladores imprevistos de genes cercanos, ya que podríamos obtener conclusiones incorrectas con respecto a la función del gen mutado. Por eso, en paralelo, sería conveniente añadir experimentos previos con agentes químicos o herramientas genéticas que bloqueen o activen el gen de interés.

Si disponemos de más información sobre el gen a estudiar (dominios importantes bien caracterizados, regiones conservadas evolutivamente, por ejemplo) se podría considerar afinar en el diseño en el sentido de pequeñas o grandes deleciones (un exón completo) que mantengan la fase de lectura o mutaciones puntuales de un dominio bien estudiado. Estas mutaciones escaparían de la degradación del mRNA evitando la expresión de genes compensadores (ver Figura 3) y dando lugar a una proteína carente de función.

### Cómo evitar compensación génica

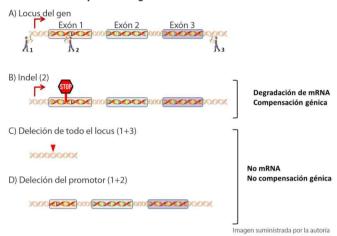


Figura 3.- Diferentes estrategias para evitar la compensación génica.

A) Esquema del locus de un gen en el que se observa su región promotora, exones e intrones. Sobre ella se indican los puntos de edición génica (1-3). B) La mutación por inserción/deleción (indel) sobre el exón será reconocida por la maquinaria de degradación del RNA y se activará la compensación génica. C y D) Podemos evitar la compensación génica diseñando dos puntos de edición génica (3+1, C) que darán como resultado la deleción de todo el locus, o bien eliminando la región promotora del gen (1+2, D). En ambas situaciones no tendrá lugar la transcripción del RNA y por tanto no se activará el mecanismo de compensación génica descrito en la Figura 2. Obrero con martillo y cincel: representa la técnica de edición del genoma. Flecha roja: representa una región promotora. Punta de flecha roja: deleción.

Estas estrategias nos ayudarían a descartar que los fenotipos observados en el modelo KO están afectados por el mecanismo de compensación génica<sup>8,9</sup>.

### CONSECUENCIAS PARA LAS ENFERMEDADES GENÉTICAS HUMANAS

Análisis de secuencias muestran que cada uno de nosotros lleva la nada tranquilizadora cantidad de alrededor de 100 variantes de pérdida de función en homocigosis y aproximadamente 20 genes completamente inactivados <sup>10</sup>.

Un estudio de más de 500.000 genomas humanos donde se examinaban 874 genes identificó a 13 individuos llevando mutaciones que causan enfermedad en 8 genes diferentes sin ninguna manifestación clínica de enfermedad<sup>11</sup>. Otro estudio del 2015 mostró que cerca del 8% de la población islandesa eran portadores de mutaciones de pérdida de función en homocigosis, sugiriendo que la presencia de PTC en los alelos es más común de lo que pensamos<sup>12</sup>. Recientemente, un análisis de 219 poblaciones

de toda Asia ha revelado que el 43% de los genes que codifican proteínas contiene al menos una variante de proteína truncada 13.

Todos estos estudios identificaron individuos aparentemente sanos con mutaciones de pérdida de función, sugiriendo que la pérdida de función en homocigosis es tolerada bastante bien. Es probable que la tolerancia o robustez genética sea consecuencia de la activación de mecanismos de compensación génica, ya que no se observan fenotipos en los individuos con alelos portadores de mutaciones severas. Además, aunque hay que tener en cuenta otros factores, explicaría la penetrancia incompleta asociada a algunas mutaciones, que puede ser debida a una respuesta compensatoria disparada en algunos individuos, pero no en otros.

Entender los mecanismos de compensación génica puede ayudarnos a interpretar porqué algunas mutaciones causan la enfermedad y otras no. Igualmente, también nos puede permitir desarrollar terapias más efectivas que aumenten la robustez del organismo frente a una mutación. La estrategia estaría enfocada más que a corregir su defecto, a disparar la transcripción de los genes parálogos o relacionados que compensen la función del gen defectivo. Podríamos pensar en tomar un medicamento cuya naturaleza química consistiera en un RNA del gen defectivo conteniendo un PTC. No es una idea descabellada si pensamos que en el ser humano cada gen tiene una media de 4 transcritos alternativos por proteína codificada por el mismo gen (la media del ratón es 2,4 trascritos alternativos por proteína). En algunos casos llegan a detectarse hasta 13 transcritos diferentes. Con tanto procesamiento alternativo es probable que el mecanismo de vigilancia del RNA (NMD) sea incluso más crucial y por tanto la aplicación terapéutica mencionada tenga mucho más impacto.

De este modo, utilizando todas las herramientas de las que disponemos, desde los modelos animales a las técnicas computacionales, tenemos que seguir profundizando para entender completamente la compensación génica, ya que todavía no está todo explicado.

La biología nos da una enseñanza de vida: *Cuando una puerta se cierra, otra se abre, para compensar* (modificado del refranero español). Por eso, desde aquí, aunque nos hayamos quedado sin el júbilo de tener otro Nobel español (*NOBEL*<sup>-/-</sup>), lo compensamos con el hecho de que Francis Mojica (*VOCACIÓN*<sup>-/-</sup>) ha hecho visible la ciencia básica y la investigación española en los foros más importantes de la Ciencia. Gracias Francis.

### **ANIMALES DE LABORATORIO**

INVIERNO 2021 / NÚMERO 88

### **GLOSARIO**

- Robustez genética: capacidad de un organismo de soportar mutaciones sin ser destruido o alterado significativamente.
- Epigenética: ciencia que estudia los mecanismos que regulan la expresión de los genes sin una modificación en la secuencia del DNA.
- Cambios epigenéticos: cambios heredables en el DNA e histonas que no implican alteraciones en la secuencia de nucleótidos y modifican la estructura y condensación de la cromatina por lo que afectan la expresión génica y el fenotipo.
- Parálogos: genes con un alto grado de identidad, pero que ambos se encuentran dentro del genoma de una especie. Por lo tanto, uno de ellos ha aparecido por duplicación del otro,
- Ortólogos: genes que son copias divergentes de un mismo gen o son similares en diferentes especies por haberse originado en un ancestro común.
- Mutación hipomórfica: mutación cuyo efecto es una reducción en la funcionalidad de la proteína resultante, obteniéndose un fenotipo leve.
- Variantes por pérdida de función: son aquellos cambios en el DNA que producen una reducción o eliminación de la proteína bien por la presencia de un codón prematuro de parada, un cambio en el marco de lectura, o un procesamiento incorrecto del RNA.
- RNA maduro: RNA con modificaciones necesarias para el proceso normal de traducción y para su estabilidad. Las modificaciones del transcrito de RNA son la adición de una caperuza (un nucleótido de guanina modificado) en el extremo 5', y de una cola de poli-A (adenina) en el extremo 3'.

### **BIBLIOGRAFÍA**

- 1. El-Brolosy M.A. and Stainer D.Y.R. Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. PLoS Genet. 2017;13:e1006780.
- Rossi A., Kontarakis Z., Gerri C., et al. Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. Nature. 2015;524:230-3.
- 3. El-Brolosy M.A., Kontarakis Z., Rossi A., et al. Genetic compensation triggered by mutant mRNA degradation. Nature. 2019;568:193-7.
- Ma Z., Zhu P., Shi H., et al. PTC-bearing mRNA elicits a genetic compensation response via Upf3a and COMPASS components. Nature. 2019;568:259-63.
- De Souza A.T., Dai X., Spencer A.G., et al. Transcriptional and phenotypic comparisons of Ppara knockout and siRNA knockdown mice. Nucleic Acids Res. 2006;34:4486-94.
- Freudenberg J.M., Ghosh S., Lackford B.L., et al. Acute depletion of Tet1dependent 5-hydroxymethylcytosine levels impairs LIF/Stat3 signaling and results in loss of embryonic stem cell identity. Nucleic Acids Res. 2012;40:3364-77.
- O'leary M.N., Schreiber K.H., Zhang Y., et al. The ribosomal protein Rpl22 controls ribosome composition by directly repressing expression of its own paralog, Rpl22l1. PLoS Genet. 2013;9:e1003708.
- 8. Brooks P.C., Montgomery A.M., Rosenfeld M., et al. Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. Cell. 1994;79:1157-64.
- Bader B.L., Rayburn H., Crowley D., et al. Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all alpha vintegrins. Cell. 1998;95:507-19.
- 10. Genomes Project C., Abecasis G.R., Altshuler D., et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. Nature. 2010;467:1061-73.
- 11. Chen R., Shi L., Hakenberg J., et al. Analysis of 589,306 genomes identifies individuals resilient to severe Mendelian childhood diseases. Nat Biotechnol. 2016;34:531-8.
- 12. Sulem P., Helgason H., Oddson A., et al. Identification of a large set of rare complete human knockouts. Nat Genet. 2015;47:448-52.
- 13. GENOMEASIA, K.C. The GenomeAsia 100K Project enables genetic discoveries across Asia. Nature. 2019;576:106-11.

# Propuesta de protocolos anestésicos/analgésicos para rata, ratón, hámster y conejo en función de la severidad de los procedimientos

**Álvaro Parreño Manchado y Luis Muñoz de la Pascua** Servicio de Experimentación Animal. Universidad de Salamanca

Palabras clave: protocolo, anestesia, analgesia.

### INTRODUCCIÓN

El uso de protocolos analgésicos y anestésicos en el desarrollo de los procedimientos es una actuación cotidiana en nuestros centros de investigación. La elección de estos está condicionada por disparidad de criterios, como pueden ser la severidad del procedimiento y los condicionantes experimentales. Así, existen multitud de combinaciones posibles de fármacos, de las cuales, tendemos a emplear aquellas más prácticas y efectivas. La severidad del procedimiento empleado es el factor que más va a condicionar nuestra elección de combinaciones de fármacos junto a la posología empleada, sin olvidar los medios disponibles en cada centro y su disponibilidad comercial.

El objetivo de este trabajo es proponer unas tablas con pautas generales para la sedación, inmovilización, anestesia y analgesia, usando combinaciones de fármacos disponibles comercialmente en nuestro país. Dichas combinaciones son propuestas en función del grado genérico de severidad establecido para el procedimiento. Las posologías y combinaciones están basadas en

otras comúnmente propuestas en la literatura, así como, en las páginas webs de diversos centros de investigación y de centros universitarios. Las tablas que proponemos deben considerarse orientativas, debiéndose consultar con el personal veterinario para adaptar las dosis a cada especie y linaje; estado de salud (p. Ej. animales enfermos); edad (p. Ej. de avanzada edad o geriátricos); sexo; u otras consideraciones clínicas o experimentales. Igualmente, estas tablas son orientativas en espera de estudios y revisiones más recientes que puedan haberse publicado sobre la efectividad de las dosis de los fármacos reflejados o nuevas formulaciones.

En nuestra propuesta para los protocolos analgésicos (ver Tablas 1-10), se ha optado por una analgesia multimodal tanto preoperatoria como postoperatoria. La administración preventiva de analgésicos (preoperatorios) previene la aparición de fenómenos de sensibilización, disminuyendo la intensidad del dolor postoperatorio y la cantidad de analgésicos necesarios.

Tabla 1.- Protocolos recomendados en función de la severidad (ratón, rata y hámster).

	FÁRMACOS		
SEVERIDAD PROCEDIMIENTO	Pre-anestesia /Sedación	Anestesia /Sedación	Post-anestesia /Sedación
A) Leve: Sin cirugía (inmovilización, técnicas de imagen)	NO	Inhalatorios o parenterales	NO
B) Leve: Cirugía menor (biopsias de piel, rabo, implantación de dispositivos subcutáneos, inflamaciones leves)	Anest. Local + AINE (opcional)	Inhalatorios o parenterales (opcional)	AINE (opcional)
C) Moderado-Severo: Cirugía mayor (toracotomías, laparotomías, craneotomías, dolor crónico)	Anest. Local + AINE + opiáceo	Inhalatorios o parenterales	AINE + opiáceo

### **ANIMALES DE LABORATORIO**

INVIERNO 2021 / NÚMERO 88

Tabla 2.- Protocolos para ratón.

	FÁRMACOS (mg/kg) o (%)		
SEVERIDAD PROCEDIMIENTO	Pre-anestesia /Sedación	Anestesia /Sedación	Post-anestesia /Sedación
<b>A) Leve:</b> Sin cirugía	NO	Isoflurano: Inducción 3-5% Mantenimiento 1-3% Ketamina/Diazepam (100/5) IP, 20-30 min Ketamina/Acepromacina (100/5) IP, 20-30 min	NO
<b>B) Leve:</b> Cirugía menor, inflamación	Lidocaína (1-4) y/o Bupivacaína (1-2) SC o intraincisional	Isoflurano: Inducción 3-5% Mantenimiento 1-3% Ketamina/Diazepam (100/5) IP, 20-30 min Ketamina/Acepromacina (100/5) IP, 20-30 min Ketamina/Xilacina (80-100/5-12) IP, 30-45 min	Carprofeno (5) o Meloxicam (1-2) SC 1-3 días, cada 12-24 h
<b>C) Moderado-Severo:</b> Cirugía mayor, etc <sup>1</sup> .	Lidocaína (1-4) y/o Bupivacaína (1-2) SC o intraincisional + Meloxicam (1-2) SC + Buprenorfina (0,05-0,2) SC o Fentanilo (0,01-0,5) IP, cada 20 min	Isoflurano: Inducción 3-5% Mantenimiento 1-3% Ketamina/Xilacina (80-100/5-12) IP, 30-45 min Ketamina/Medetomidina o Dexmedetomidina (75-100/1) IP, 30-45 min Ketamina/Xilacina/ Acepromacina (100/10/3) IP, 45-60 min	Carprofeno (5) o Meloxicam (1-2) SC 3-5 días, 24h + Buprenorfina (0,05-0,2) SC 3-5 días, 8-12h

Tabla 3.- Protocolos para rata.

	FÁRMACOS (mg/kg) o (%)		
SEVERIDAD PROCEDIMIENTO	Pre-anestesia /Sedación	Anestesia /Sedación	Post-anestesia /Sedación
<b>A) Leve:</b> Sin cirugía	NO	Isoflurano: Inducción 3-5%  Mantenimiento 1-3%  Ketamina/Diazepam (50-75/5-10) IP, 20-30 min  Ketamina/Acepromacina (75/2,5) IP, 20-30 min	NO
<b>B) Leve:</b> Cirugía menor, inflamación	Lidocaína (1-4) y/o Bupivacaína (1-2) SC o intraincisional	Isoflurano: Inducción 3-5%  Mantenimiento 1-3%  Ketamina/Diazepam (50-75/5-10) IP, 20-30 min  Ketamina/Acepromacina (75/2,5) IP, 20-30 min  Ketamina/Xilacina (75-100/5-12) IP 30-45 min	Carprofeno (5) o Meloxicam (1-2) SC 1-3 días, cada 12-24 h
<b>C) Moderado-Severo:</b> Cirugía mayor, etc <sup>1</sup> .	Lidocaína (1-4) y/o Bupivacaína (1-2) SC o intraincisional + Meloxicam (1-2) SC + Buprenorfina (0,01-0,05) SC o Fentanilo² (0,01-0,3) IP, cada 20 min	Isoflurano: Inducción 3-5%  Mantenimiento 1-3%  o Ketamina/Xilacina (75-100/5-12) IP, 30-45 min  o Ketamina/Medetomidina o Dexmedetomidina (70-90/0,5-1) IP 30-45 min  O Ketamina/Xilacina/ Acepromacina (40-50/5/1) IP, 45-60 min	Carprofeno (5) o Meloxicam (1-2) SC 3-5 días, 24h + Buprenorfina (0,01-0,05) SC 3-5 días, 8-12h

Tabla 4.- Protocolos para hámster.

SEVERIDAD	RIDAD FÁRMACOS (mg/kg) o (%)		
PROCEDIMIENTO	Pre-anestesia/Sedación	Anestesia/Sedación	Post-anestesia/Sedación
A) Leve: Sin cirugía	NO	Isoflurano: Inducción 3-5%  Mantenimiento 1-3%  Ketamina/Diazepam (70/2) IP, 30-45 min  Ketamina/Acepromacina (150/5) IP, 45-120 min	NO
<b>B) Leve:</b> Cirugía menor, inflamación	Lidocaína (1-4) y/o Bupivacaína (1-2) SC o intraincisional	Isoflurano: Inducción 3-5% Mantenimiento 1-3% Ketamina/Diazepam (70/2) IP, 30-45 min Ketamina/Acepromacina (150/5) IP, 45-120 min Ketamina/Xilacina (100-200/5-10) IP, 30-45 min	Carprofeno (5) o Ketoprofeno (5) SC o Meloxicam (1-2) SC, PO 1-3 días, cada 24 h
C) Moderado-Severo: Cirugía mayor, etc¹.	Lidocaína (1-4) y/o Bupivacaína (1-2) SC o intraincisional + Meloxicam (1-2) SC + Buprenorfina (0,01- 0,05) SC o <sup>2</sup> Fentanilo (0,01-0,5) IP, cada 20 min	Isoflurano: Inducción 3-5% Mantenimiento 1-3%  Ketamina/Xilacina (100-200/5-10) IP 30-45 min  Ketamina/Medetomidina o Dexmedetomidina (75-100/0,25) IP 30-45 min  Ketamina/Xilacina/Acepromacina (50-100/10/1) IP, 45-90 min	Carprofeno (5) o Meloxicam (1-2) SC o Ketoprofeno (5) SC o 3-5 días, 24h + Buprenorfina (0,01-0,05) SC 3-5 días, 8-12h

<sup>1.</sup> En procesos clínicos no quirúrgicos donde se requieran terapias paliativas del dolor moderado o severo, usar la columna post-anestesia para la elección de analgésicos (consultar RD 53/2013, ANEXO IX).

Tabla 5.- Autoadministración analgésica en rata y ratón.

* FÁRMACO	DOSIS (mg/kg) PO	
	1-3 (5-15 μg/ml gelatina) ratón	
Buprenorfina	0,4 (rata), 1 mg (ratón) (0,2 mg /1 g Nutella)	
	0,03 mg/ pellet (ratón)	
	0,05 mg/ml en agua (ratón/rata)	
Ibuprofeno	50-60 mg/kg/día – 10 ml (20 mg/ml) en 500 ml de agua. Frecuencia: en agua (ratón). Cambio de agua cada 3 días.	
050	60-150 mg/kg/día – 25 ml (20 mg/ml) en 475 ml de agua. Frecuencia: en agua (rata). Cambio de agua cada 3 días.	

<sup>\*</sup> Analgésico administrado oralmente (autoadministrado): requiere de una supervisión frecuente de la ingesta para tener la certeza de que alcance la dosis terapéutica.

Todas las dosis de fármacos en agua de bebida son aproximaciones basadas en el consumo diario normal de agua para una especie determinada. Se han descrito respuestas neofóbicas al añadir fármacos analgésicos al agua de los roedores, lo que puede causar pérdida de peso, pero suele ser temporal. Los fármacos analgésicos deberían añadirse al agua varios días antes del procedimiento que puede causar dolor, para dar a los roedores la oportunidad de aclimatarse al cambio en el agua de bebida. Los fármacos analgésicos que se administran a través del agua de bebida no deberían utilizarse como única fuente de analgesia durante las primeras 24 horas después de un procedimiento doloroso.

Tabla 6.- Protocolos para conejo.

	FÁRMACOS		
SEVERIDAD PROCEDIMIENTO	Pre-anestesia /Sedación	Anestesia /Sedación	Post-anestesia /Sedación
A) Leve: Sin cirugía (inmovilización, técnicas de imagen)	Sedante	Inhalatorios o parenterales	NO
B) Leve: Cirugía menor (biopsias de piel, rabo, implantación de dispositivos subcutáneos, inflamaciones leves)	Sedante + Anest. local + AINE (opcional)	Inhalatorios o parenterales (opcional)	AINE (opcional)
C) Moderado-Severo: Cirugía mayor (toracotomías, laparotomías, craneotomías, dolor crónico)	Sedante + Anest. local + AINE + opiáceo	Inhalatorios o parenterales	AINE + opiáceo

<sup>2.</sup> Fentanilo: duración del efecto de unos 20 minutos, redosificar durante la anestesia si esta supera este tiempo.

### **ANIMALES DE LABORATORIO**

INVIERNO 2021 / NÚMERO 88

Tabla 7.- Protocolos para conejo.

SEVERIDAD	FÁRMACOS (mg/kg) o (%)		
PROCEDIMIENTO	Pre-anestesia /Sedación	Anestesia /Sedación	Post-anestesia /Sedación
		Isoflurano: Inducción 3-5% Mantenimiento 1-3%	
A) Leve: Sin cirugía	Diazepam (0,5-3) IM, IV O Midazolam (0,25-2) IM, IV, SC	Ketamina/Diazepam (10-40/0,2-5), IM, SC, 20-30 min	NO
		Ketamina/Acepromacina (50/1) IM, 20-30 min	
		Isoflurano: Inducción 3-5% Mantenimiento 1-3%	0(0.4)
B) Leve:	B) Leve: Cirugía menor, inflamación  Midazolam (0,25-2) IM + Lidocaína (1-4) y/o Bupivacaína (1-2) SC o intraincisional	Ketamina/Diazepam (10-40/0,2-5) IM, SC, 20-30 min	Carprofeno (2-4) o Meloxicam (0,2-1) SC, PO, 1-3 días cada 24 h o Ibuprofeno (2-7.5) PO
		Ketamina/Acepromacina (50/1), IM, 20-30 min	cada 12-24 h o Ketoprofeno (1-3) IM 1-3 días, cada 24 h
		Ketamina/Xilacina (10-50/3-5) IM, IV, SC, 30-45 min	1-5 dias, cada 24 fi
	Midazolam (0,25-2) IM	Isoflurano: Inducción 3-5% Mantenimiento 1-3%	Carprofeno (2-4) o
C) Moderado- Severo: Cirugía mayor, etc¹.  + Lidocaína (1-4) y/o Bupivacaína (1-2) SC o intraincisional + Meloxicam (0,2-1) SC + Buprenorfina (0,01-0,05) SC o	Ketamina/Xilacina (10-50/3-5) IM, IV, SC, 30-45 min	Meloxicam (0,2-1) SC, PO 3-5 días, 24h + Buprenorfina (0,01-0,05) IM, IP, SC, 3-5 días, 8-	
	Ketamina/Medetomidina o Dexmedetomidina (15-35/0,125-0,25) IM, SC, 30-45 min	12h o Fentanilo (25 mcg/h) TD 3-5 días cada 72h	
	<sup>2</sup> Fentanilo (25 mcg/h) TD, cada 72 h	Ketamina/Xilacina/Acepromacina (35/5/1) IM, IV, SC, 45-90 min	5-5 did5 6dda 7211

<sup>1.</sup> En procesos clínicos no quirúrgicos donde se requieran terapias paliativas del dolor moderado o severo, usar la columna post-anestesia para la elección de analgésicos (consultar RD 53/2013, ANEXO IX).

Tabla 8.- Autoadministración analgésica en conejo.

* FÁRMACO	DOSIS (mg/kg) PO
Paracetamol	200-500 1-2 mg/ml en agua de bebida con supervisión, porque una sobredosificación puede causar daño hepático.
Paracetamol/Codeína (120 P:12 C mg/5ml)	1 ml elixir / 100 ml en agua de bebida

<sup>\*</sup> El analgésico administrado oralmente (autoadministrado): requiere de una supervisión frecuente de la ingesta para tener la certeza de que alcance la dosis terapéutica.

Todas las dosis de fármacos en agua de bebida son aproximaciones basadas en el consumo diario normal de agua para una especie determinada. Los fármacos analgésicos deberían añadirse al agua varios días antes del procedimiento que puede causar dolor, para dar a los conejos la oportunidad de aclimatarse al cambio en el agua de bebida. Los fármacos analgésicos que se administran a través del agua de bebida no deberían utilizarse como única fuente de analgesia durante las primeras 24 horas después de un procedimiento doloroso.

Tabla 9.- Anestésicos locales.

ANEST. LOCAL	INICIO EFECTO (minutos) / DURACIÓN (horas)	
Crema EMLA*	na EMLA* 30 / 2	
Lidocaína **	5 / <1	
Bupivacaína 15 / 4-8		
	ona en la zona quirúrgica. ción conejo, aplicación laringofaríngea)	

Tabla 10.-Otros fármacos usados.

FÁRMACO	DOSIS (mg/kg)
*Atropina	0,05 SC (IM, SC conejo)
*Glicopirrolato	0,01-0,1 SC (IM, IV, SC conejo)
**Atipamezol	0,1-1 IM, IV, IP, SC
***Flumacenilo	1 IM, IV
****Buprenorfina	0,01-01 IM, SC

<sup>\*</sup>Antibradicárdico (uso de glicopirrolato en conejos que presentan atropinasas).

\*\*Antagoniza la acción de la xilacina, medetomidina y dexmedetomidina.

\*\*\*Antagoniza la acción de las benzodiacepinas (diazepam, midazolam).

\*\*\*\*Antagoniza parcialmente la acción de agonistas µ puros (fentanilo, morfina...).

<sup>2.</sup> Fentanilo: colocar 12-24 horas antes del inicio de la cirugía en una zona de piel en la que se ha recortado el pelo (NO afeitar ni usar crema depilatoria, ya que cambia la farmacocinética del medicamento).

### DISCUSIÓN

En relación con la elección de los fármacos empleados y su posología, se han omitido intencionadamente fármacos, cuyo intervalo entre dosis (<8-12 horas), implique administración nocturna, o que puedan aumentar el estrés y sus efectos adversos debidos a la manipulación frecuente de los animales (Schaap M. et al. 2012).

Por otro lado, las terapias analgésicas mediante autoadministración, como las gelatinas o soluciones azucaradas, requieren de una supervisión continua para garantizar la dosis terapéutica recomendada, siendo ese aspecto muy importante para garantizar su efectividad. El apetito de los animales puede estar asimismo disminuido a causa del dolor, el estrés quirúrgico, o una recuperación tardía de la anestesia, por lo que la ingesta de alimento y agua puede verse comprometida. Debido a esta posible limitación, algunos protocolos aumentan la frecuencia de administración las primeras 24 horas.

En procedimientos donde sea vital el uso de terapia paliativa de larga duración con dolor severo, se debe contemplar el uso de dispositivos de administración continua, como las bombas osmóticas (p. Ej. bombas osmóticas ALZET®). Para procedimientos quirúrgicos de duración mayor a una hora, es recomendable el uso de anestesia inhalatoria. Es necesario también, valorar la posología usada en función de la evaluación periódica del dolor y la posible interferencia experimental.

Por último, debemos prestar atención a la aparición en el mercado de nuevos fármacos analgésicos de liberación sostenida, cuyo uso puede ser en el futuro inmediato, un recurso idóneo para el manejo del dolor posterior inmediato al procedimiento o en patologías crónicas. Entre ellos, podemos citar los ya comercializados Meloxicam SR® (Mexas A.M., et al.) o Buprenorphine SR®, los cuales permiten espaciar las dosis en el tiempo disminuyendo el estrés de la administración. De igual modo sería interesante disponer de presentaciones comercializadas como medicamentos de uso humano, como los parches transdérmicos de opiáceos (p. Ej. fentanilo y buprenorfina), que pueden ser de mucha utilidad en algunas especies y modelos experimentales.

### **BIBLIOGRAFÍA**

- Abelson K., Jacobsen K., Sundbom R., et al. Voluntary ingestion of nut paste for administration of buprenorphine in rats and mice. Lab Anim. 2012;46:349-51.
- Alemán-Laporte J., Bandini L.A., Garcia-Gomes M., et al. Combination of ketamine and xylazine with opioids and acepromazine in rats: Physiological changes and their analgesic effect analysed by ultrasonic vocalization. Lab Anim. 2020;54:171-82.
- Arras M., Autenried P., Rettich A., et al. Optimization of Intraperitoneal Injection Anesthesia in Mice: Drugs, Dosages, Adverse Effects, and Anesthesia Depth. Com Med. 2001;51:443-56.
- Flecknell P. Analgesia and Post-operative Care. Laboratory Animals Anaesthesia. 3a Ed. Elsevier. 2009;139-79.
- Flecknell, P. Rodent analgesia: Assessment and Therapeutics. Vet J. 2018,232:70-7.
- Gargiulo S., Greco A., Gramanzini M., et al. Mice Anesthesia, Analgesia, and Care, Part.l: Anesthetic Considerations in Preclinical Research. ILAR J. 2012;53:E55-69.
- Gómez de Segura I. and Benito de la Víbora J. Métodos de Anestesia y Analgesia. Ciencia y Tecnología del Animal de Laboratorio. 2ª Ed. Editorial Universidad de Alcalá, SECAL. 2008;2:97-128.
- Goldschlager G.B., Gillespie V.L., Palme R., et al. Effects of Multimodal Analgesia with Low-Dose Buprenorphine and Meloxicam on Fecal Glucocorticoid Metabolites after Surgery in New Zealand White Rabbits (Orictolagus cuniculus). J Am Assoc Lab Anim Sci. 2013;52:571-6.
- Henke J., Haberstroh J., Sager M., et al. Pain management for laboratory animals. GV-solas. 2015:1-69.
- Herrmann K. and Flecknell P. Retrospective review of anesthetic and analgesic regimens used in animal research proposals. ALTEX. 2019,36:65-80.
- Hovard A.M.B., Teilmann A.C., Hau J., et al. The applicability of a gel delivery system for self-administration of buprenorphine to laboratory mice. Lab Anim. 2015;49:40-5.
- Foley P.L., Henderson A.L., Bissonette E.A., et al. Evaluation of Fentanyl Transdermal Patches in Rabbits: Blood Concentrations and Phisiologic Response. Comp Med. 2001;51:239-44.
- Mexas A.M., Herrod J.A., Veltri C.A., et al. Inappropiate Post-operative analgesia is achieved using recommended doses of sustined-released meloxicam in mice. J Animal Health Behav Sci. 2017;1:109.
- Molina-Cimadevilla M.J., Segura S., Merino C., et al. Oral selfadministration of buprenorphine in the diet for analgesia in mice. Lab. Animal. 2014;48:216-24.

**ANIMALES DE LABORATORIO** 

INVIERNO 2021 / NÚMERO 88

- Schaap M., Uilenreef J.J., Mitsogiannis M.D., et al. Optimizing the dosing interval of buprenorphine in a multimodal postoperative analgesic strategy in the rat: minimizing side effects without affecting weight gain and food intake. Lab Anim. 2012;46:287-92.
- Terrance Hawk C., Leary S.L., and Morris T.H. *Analgesics and Sedatives*. Formulary for Laboratory Animals. 3<sup>a</sup> Ed. Editorial Blackwell Publishing. 2005;15-42.
- Terrance Hawk C., Leary S.L., and Morris T.H. Anesthetics. Formulary for Lab Anim. 3° Ed. Editorial Blackwell Publishing. 2005;43-70.
- The University of British Columbia. Rat and Mouse anesthesia and analgesia. Formulary and General Drug Information. Approved: March 2nd, 2016. https://animalcare.ubc.ca/sites/default/files/documents/Guideline%20-%20Rodent%20Anesthesia%20Analgesia%20Formulary%20%282016%29.pdf
- The University of British Columbia. Adult Rodent Anesthesia SOP. Approved: July 5, 2017. https://animalcare.ubc.ca/sites/default/files/documents/ACC-01-2017%20Rodent%20Anesthesia.pdf
- Universidad de Málaga. Analgesia Quirúrgica. Refinamiento en protocolos quirúrgicos en animales de experimentación. https://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/cicuae/ Protocolos\_analgesia\_roedores.pdf
- Universidad de Michigan. ULAM Guidelines on Anesthesia and Analgesia in mice. Actualizada 6 de Agosto, 2020. https://az.research. umich.edu/animalcare/guidelines/guidelines-anesthesia-and-analgesia-mice
- Universidad de Minnesota. Anesthesia Guidelines: rats, mice, hamsters, rabbit. https://www.researchservices.umn.edu/services-name/research-animal-resources/research-support/guidelines/anesthesia-rats, https://www.researchservices.umn.edu/services-name/research-animal-resources/research-support/guidelines/anesthesia-mice, https://www.researchservices.umn.edu/services-name/research-animal-resources/research-support/guidelines/anesthesia-hamsters, https://www.researchservices.umn.edu/services-name/research-animal-resources/research-support/guidelines/anesthesia-rabbits
- Universidad de Pensilvania. IACUC Guideline. Mouse Anesthesia and Analgesia Recommendations. Approved: May 28th, 2014.https://www.spandidos-publications.com/var/MouseAnesthesiaAnalgesia Recommendations.pdf

# HAZTE SOCIO BENEFACTOR

TU EMPRESA TAMBIÉN PUEDE SER PARTE DE LA SECAL



Estamos en el centro de la investigación en habla hispana





# Alternativas al uso de animales en el estudio de la diabetes, también durante la gestacional

Carmen Valverde-Tercedor<sup>1</sup>, Silvia Muñoz-Descalzo<sup>1</sup>, Joaquín Lilao-Garzon<sup>1</sup>, Yeray Brito-Casillas<sup>1</sup> y Ana Mª Wägner<sup>1,2</sup>
<sup>1</sup>Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria
<sup>2</sup>Complejo Hospitalario Universitario Insular Materno-Infantil de Gran Canaria

Palabras clave: organoides, cultivos, in vitro.

### INTRODUCCIÓN

El principio de las 3Rs fue introducido en los años 60 y establece los estándares aceptados para investigar con animales. Estos principios han sido endorsados e incorporados de una manera responsable en las prácticas de todos los científicos y forman parte de las leyes nacionales e internacionales que regulan el uso de animales en procedimientos científicos. Las 3Rs son: reemplazo, reducción y refinamiento.

El Reemplazo consiste en crear y promover métodos que ayuden a sustituir el uso de animales. Un planteamiento alternativo a la experimentación con animales sería el uso de métodos *in vitro*. Aunque, actualmente, sea complicado que los modelos *in vitro* reemplacen totalmente a los modelos animales, sí que pueden reducir bastante el número de animales empleados en experimentación¹.

Una ventaja de los modelos *in vitro* es que no están sujetos a las limitaciones metodológicas y legales, como los estudios en humanos y animales; y, además, pueden ayudarnos a comprender los mecanismos de enfermedades, sus complicaciones, y a la larga, su prevención y tratamiento.

Sin embargo, no siempre es fácil elegir el modelo *in vitro* más adecuado, y en el caso de trastornos metabólicos complejos como es la diabetes mellitus (DM), puede ser especialmente complicado. Este artículo se centra en la descripción de modelos *in vitro* para estudiar la diabetes en general y la diabetes asociada a la gestación.

### **PUNTO DE PARTIDA**

Es importante subrayar que, antes de empezar con un estudio *in vitro*, deben tenerse en cuenta, principalmente, dos aspectos:

- 1. La elección del modelo: el modelo debe seleccionarse de acuerdo con el objetivo del estudio, y debe estar claramente definido: ¿en qué tipo de DM nos estamos enfocando? ¿es una diabetes tipo 1 (DM1), diabetes tipo 2 (DM2), o diabetes asociada a la gestación lo que queremos evaluar? Y específicamente respecto al embarazo, ¿se trata de una diabetes pregestacional o gestacional?
- 2. El entorno experimental: el ambiente experimental (y control) elegido, debe imitar la DM (y control sano) lo más fielmente posible. Según la Asociación Americana de Diabetes (ADA), la DM en humanos se define por unas concentraciones de glucosa en plasma en ayunas por encima de 126 mg/dl o concentraciones de glucosa determinadas en momentos aleatorios (o tras una sobrecarga oral de 75 g de glucosa) por encima de 200 mg/dl<sup>2</sup>. El diagnóstico de la diabetes mellitus gestacional (DMG) se basa en la realización de sobrecargas orales de glucosa, uno de los métodos más empleados consta de dos pasos: una primera sobrecarga oral, en la que se administra una dosis de 50 g de glucosa en ayunas a las madres embarazadas y se determina la glucosa plasmática pasada una hora de la administración (test de O'Sullivan). Si después de la hora los valores son de 140 mg/dl, la prueba de cribado sería positiva. Para el diagnóstico definitivo, se realizaría otra sobrecarga administrándose 100 g de glucosa en ayunas, y se mediría la glucosa en plasma: antes, a la hora, a las dos y a las tres horas tras la administración. Si se tienen dos o más valores iguales o superiores a 95 mg/dl en ayunas, 180 mg/dl a la hora, 155 mg/dl a las dos horas ó 140 mg/dl a las 3 horas (criterios de Carpenter y Coustan), se diagnostica de DMG<sup>2</sup>. Una mujer gestante con diabetes diagnosticada previamente a la gestación tendrá una diabetes pregestacional.



INVIERNO 2021 / NÚMERO 88



A continuación, se explican con más detalle las diferentes opciones que existen hasta el momento en cuanto a modelos *in vitro*, para elegir aquél que más se ajuste a nuestro estudio, y establecer el entorno experimental diabético.

### 1. Elección del modelo. Tipos de modelos in vitro

En los últimos años ha habido un progreso notable en el desarrollo de modelos *in vitro* para estudiar la DM y la DMG.

Los diferentes modelos *in vitro* se explican siguiendo el esquema que se recoge en la Tabla 1:

Tabla 1.- Modelos in vitro de diabetes y diabetes gestacional.

	a) Modelos celulares
Modelos in vitro de	b) Islotes pancreáticos aislados
	c) Células madre humanas
	d) Cultivo 3D. Organoides
	e) Cultivo de hepatocitos y células del músculo esquelético
Modelos <i>in vitro</i> de diabetes asociada a la gestación	a) Líneas celulares primarias
	b) Células de coriocarcinoma
	c) Células inmortalizadas
	d) Células madre trofoblásticas
	e) Organoides placentarios
	f) Cultivos embrionarios

### 1.1. Modelos in vitro de diabetes

La elección del modelo *in vitro* dependerá del objetivo del estudio (ver Tabla 2). Si, por ejemplo, se quiere estudiar la secreción de insulina, se hará mediante células  $\beta$  e islotes pancreáticos; y si se quiere estudiar la acción o sensibilidad a la insulina, se hará mediante el estudio de los tejidos diana (músculo, hígado, tejido adiposo y la propia célula  $\beta$ ). A continuación, se describen los diferentes modelos:

### a) Modelos celulares

### - Líneas celulares animales

Las líneas celulares provenientes de animales han permitido estudiar la fisiología de la DM y el desarrollo de fármacos. Los roedores han sido la principal fuente de líneas de células  $\beta$ , siendo la línea celular BRIN-BD11 una de las más utilizadas. Esta línea es empleada en el estudio de la biología de las células  $\beta$  y en la investigación farmacológica, ya que se considera que refleja con bastante fidelidad la respuesta normal a la glucosa y a otros agentes moduladores de la secreción de insulina. Otras células, en este caso obtenidas de

insulinoma de rata, son las INS-1, utilizadas por gran número de investigadores por su fácil y rápida proliferación en cultivo, aunque su respuesta a la glucosa es menor que la de los islotes primarios (ver más abajo).

### Líneas celulares humanas

El uso de una línea celular humana estable tendría una aplicación clínica más directa que el uso de líneas celulares de animales. Sin embargo, su generación no es sencilla. La mayoría de ellas tienen defectos genéticos, crecen lentamente o tienen una respuesta insuficiente a la glucosa. No obstante, también hay líneas celulares bien caracterizadas, como las líneas de células β pancreáticas NAKT-15 y 1.1 B4. La línea celular NAKT-15 es capaz de restaurar la normoglucemia en ratones diabéticos, y la línea celular 1.1 B4 se utiliza para estudiar la biología y función de las células β humanas, al igual que los efectos glucotóxicos en la expresión génica y los mecanismos de secreción de insulina. Hay que destacar también la línea estable de células β humanas EndoC-bH1, que presenta muchas aplicaciones y responde a la glucosa en un rango fisiológico. A partir de ellas se generaron las EndoCβH2 y EncoC-bH3 que son muy similares a las células β primarias.

### b) Islotes pancreáticos

El páncreas endocrino está organizado en islotes con cinco tipos de células principales, que secretan una hormona diferente: células  $\alpha$  (glucagón), células  $\beta$  (insulina), células PP (polipéptido pancreático), células  $\delta$  (somatostatina) y células  $\epsilon$  (grelina)<sup>3</sup>.

El uso de islotes pancreáticos enteros cultivados *ex vivo* tiene la ventaja de reproducir más fielmente lo que sucede *in vivo*, ya que mantienen su estructura tridimensional y contienen todos los tipos celulares. Se utilizan para estudiar la biología del páncreas endocrino, no sólo la de las células  $\beta$  sino para el desarrollo de nuevos medicamentos; y de manera especial, para estudiar intervenciones potencialmente preventivas frente al desarrollo de la DM<sup>4</sup>.

Con los años, los islotes de roedores empleados en la investigación de DM están siendo reemplazados por islotes humanos. Gracias al apoyo de diversas instituciones y programas de diabetes a nivel mundial, así como la organización de redes y consorcios, como el Consorcio del Centro de Recursos de Células de Islote (ICRCC) (http://icr.coh.org/) ha aumentado la

# **IN VITRO**

disponibilidad de islotes pancreáticos humanos para investigación, tanto de pacientes como de controles sanos. Esto ha permitido avances en relación al conocimiento de la estructura del islote, la expresión génica, la secreción de insulina, la proliferación celular y su respuesta a situaciones de estrés<sup>4</sup>.

Sin embargo, todavía no hay disponibles unos criterios universalmente aceptados para definir la calidad del islote humano. Algunos autores usan la producción de insulina para medir su calidad, proponiendo una lista de características que deberían informarse sobre cada preparación de islotes humanos: información sobre su origen, centro de aislamiento, pureza y viabilidad estimadas, tiempo total de cultivo, medición funcional y descripción del uso de islotes, entre otros<sup>4</sup>.

### c) Células madre humanas

Se pueden obtener células pancreáticas productoras de insulina mediante la diferenciación de células madre pluripotentes humanas (hPSC), células madre embrionarias humanas (hESC) y células madre pluripotentes inducidas (hiPSC). Para ello, es necesario partir de fibroblastos o células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes, reprogramar para obtener hiPSC<sup>5</sup>, y luego diferenciarlas en las células de interés.

Las hPSC son una fuente renovable de células  $\beta$  y además pueden modificarse genéticamente<sup>6</sup>. Ello supone una ventaja para la investigación de la DM humana, representando un nuevo modelo para estudiar mecanismos patogénicos y probar fármacos. Otra de las ventajas de estas células es que se pueden usar como parte de nuevas tecnologías, tales como dispositivos organ-on-a-chip, secuenciación de ARN celular, desarrollo de células hipoinmunogénicas y promoción de la vascularización de las células  $\beta^5$ .

Aunque los procedimientos para su desarrollo pueden ser relativamente largos y engorrosos, diversos grupos han logrado la optimización de estos protocolos logrando producir células progenitoras pancreáticas e islotes inmaduros. No obstante, aún queda trabajo por hacer en el proceso de obtención de células maduras capaces de secretar insulina *in vivo* en respuesta a la glucosa<sup>6</sup>.

### d) Cultivos de organoides

El desarrollo de sistemas de cultivo celular en tres dimensiones (3D) ha revolucionado el estudio de enfermedades *in vitro*; ya que, representan de manera más fidedigna la estructura

del órgano afectado que los sistemas en dos dimensiones (2D). Entre los sistemas 3D se distinguen los agregados celulares o esferoides, quistes y organoides verdaderos.

Los esferoides son agregados celulares sin un lumen central, los quistes son esferas de células epiteliales con un lumen central, mientras que los organoides verdaderos son estructuras complejas y polarizadas con un lumen central. Un organoide se puede definir como una estructura tridimensional obtenida a partir de células madre pluripotentes, células madre de tejidos neonatales o células madre o progenitoras adultas, que se organizan espontáneamente en una estructura que refleja el tejido *in vivo* a nivel de composición celular y funcional. Estos organoides se pueden usar para modelizar enfermedades *in vitro* y como fuente de material para terapia celular o trasplante.

El objetivo último de la biología de organoides para la medicina regenerativa, es generar *in vitro* órganos funcionales empleando las células propias del paciente, con el propósito de establecer una terapia celular, un trasplante o una sustitución. La mejor opción es generar los organoides empleando iPSCs derivadas de fibroblastos o células mononucleadas de sangre periférica. La generación de estas iPSCs requiere protocolos de alta complejidad técnica y precisa un profundo conocimiento de los mecanismos embrionarios y de señalización implicados en su futura diferenciación.

Los quistes pancreáticos y organoides se pueden derivar de tejidos fetales de ratón. Están compuestos por células acinares, ductales, endocrinas y exocrinas, por lo que reflejan fielmente la composición celular pancreática. También se ha conseguido generar quistes y organoides a partir de células de páncreas adultos, en los que el tipo de organoides varía dependiendo de la población celular de origen. En unos casos, están compuestos por células ductales que sólo pueden diferenciarse a células endocrinas tras su trasplante, y en otros casos se obtienen quistes formados por células endocrinas y acinares. Aunque podrían ser empleados para modelizar enfermedades del páncreas como la DM, su utilidad aún está por comprobar.

La generación de esferas pancreáticas humanas se consiguió por primera vez mediante la reprogramación de reguladores del desarrollo de los islotes. Estas esferas se pueden diferenciar en células endocrinas *in vitro*. Recientemente, empleando las condiciones de cultivo de organoides de ratón a tejidos fetales humanos, se han conseguido generar quistes pancreáticos humanos con poca capacidad de diferenciación<sup>7,8</sup>.





INVIERNO 2021 / NÚMERO 88

Varios grupos han dirigido sus esfuerzos a generar esferoides tipo islote, empleando líneas celulares hESCs o hiPSCs en lugar de generar organoides pancreáticos. Las células EndoC-BH1, EndoCβH2 y EndoC-βH3 pueden ser cultivadas como pseudo-islotes tridimensionales in vitro. Otras células, como las 1.1 B4, forman 'pseudo-islotes' de manera espontánea y muestran una mayor resistencia a toxicidad y daño de ADN que si se cultivan en monocapa<sup>9</sup>. La principal ventaja del empleo de pseudo-islotes en lugar de islotes pancreáticos de donantes es su disponibilidad; además, reproducen la actividad de los islote, pues incrementan la producción de insulina en respuesta a glucosa. Otra ventaja es que pueden ser modificados genéticamente, pero carecen de vascularización y de una estructura intrínseca<sup>10</sup>.

La funcionalidad de los organoides se puede mejorar aumentando su complejidad mediante bioingeniería con cocultivos o matrices biomiméticas. Co-cultivos de células tipo islote con células madre mesenquimales y células epiteliales amnióticas humanas mejoran el injerto, la viabilidad y la función en experimentos de trasplante debido al aumento de la vascularización. Los co-cultivos también se pueden realizar con líneas celulares como MIN6. El objetivo del empleo de matrices biomiméticas es proporcionar un ambiente extrínseco que suministre señales bioquímicas y biofísicas, incluyendo un soporte estructural, al organoide en crecimiento. Por ejemplo, organoides tipo islote a partir de hESCs empleando Matrigel y colágeno como matriz, segregan insulina en respuesta a glucosa. Finalmente, se puede emplear una mezcla de co-cultivo con matrices biomiméticas. En este caso se usaron hESCs junto con células endoteliales y un hidrogel y también segregan insulina en respuesta a glucosa.

En resumen, se han desarrollado múltiples protocolos y métodos para generar organoides pancreáticos o tipo islote, que se podrían emplear potencialmente para trasplantes de pacientes diabéticos, como alternativa al uso de animales en ciertas fases de desarrollo, o para la obtención de islotes pancreáticos.

### e) Cultivo de hepatocitos, células del músculo esquelético y tejido adiposo para el estudio de la resistencia a la insulina

Los hepatocitos y las células del músculo esquelético junto con otras células participan en el mantenimiento de los niveles de glucosa en sangre y en la eliminación de los ácidos grasos libres en plasma.

En la DM2, la resistencia a la insulina (RI) se manifiesta por el aumento de ácidos grasos libres, una mayor producción de glucosa hepática y una disminución de la absorción de glucosa en el músculo esquelético. Un exceso de ácidos grasos libres en la sangre provoca una mayor acumulación de metabolitos lipídicos en el hígado y el músculo esquelético, lo que puede empeorar aún más la RI. Por tanto, los modelos in vitro de células hepáticas y del músculo esquelético humano in vitro tienen un papel muy importante.

Una de las líneas celulares más utilizadas como modelo hepático es la HepG2, una línea celular de carcinoma hepatocelular derivada de células tumorales de hígado fetal humano y que es muy similar a las células del hígado<sup>11</sup>. Estas células se utilizan como modelo de resistencia a la insulina hepática añadiendo palmitato (ácido graso saturado) y oleato (ácido graso insaturado) en distintas proporciones al cultivo, para inducir la sobrecarga de grasas e investigar su acumulación, la citotoxicidad y la apoptosis en las células. Los resultados muestran que una alta proporción de ácido palmítico produce un efecto nocivo agudo de sobreacumulación de grasas en el hígado; por tanto, estos modelos celulares hepáticos podrían ser adecuados para investigar experimentalmente el impacto de la esteatosis hepática<sup>11</sup>. Además, estas células han sido usadas también para establecer un modelo de RI mediante palmitato y glucosamina, y estudiar el efecto hipoglucemiante de una hierba puerarina<sup>12</sup>.

Hay autores que han utilizado las células HepG2 para explicar la fisiología del receptor de insulina soluble, ya que encontraron que las características moleculares y los cambios en los niveles del receptor en estas células, eran similares a los que se producen en plasma de pacientes con diabetes. Estos hallazgos muestran que este modelo in vitro podría ser útil para determinar el mecanismo molecular subyacente a la escisión del receptor de insulina<sup>13</sup>.

Actualmente, también se están implementando cultivos en 3D. Unos autores han creado esferoides tridimensionales con HepG2 y hepatocitos primarios de ratas (rPH), utilizando fragmentos de fibra inyectable con injertos de galactosa (gSF) como sustrato. Los esferoides rPH y HepG2 muestran fuertes interacciones célula-célula y célula-fibra para promover la viabilidad celular, demostrando ser un modelo prometedor para el metabolismo de la glucosa (esferoides rPH) y los lípidos (esferoides HepG2).

Entre las líneas celulares de músculo esquelético, los miocitos C212 pueden ser usados para estudiar los mecanismos protectores del ejercicio frente a la RI inducida por lípidos, un factor clave de la DM2; al igual que para investigar el efecto de ácidos grasos, miRNAs y genes diana en la RI.

# **IN VITRO**

Ambas líneas celulares, HepG2 y C2C12, pueden usarse de manera complementaria para tener una visión más amplia de los mecanismos de RI o para ensayar con fármacos que permitan la captación de los ácidos grasos, disminuyendo así su acumulación.

La RI se puede inducir en cultivos *in vitro* de adipocitos mediante una variedad de tratamientos. Se ha visto que diferentes modelos de adipocitos *in vitro* capturan características distintas de la RI adiposa, y un tratamiento combinado de TNF- $\alpha$  e hipoxia imita mejor los cambios que se producen *in vivo* <sup>14</sup>. Los adipocitos primarios aislados de tejido adiposo de rata y las líneas celulares de fibroblastos de ratón diferenciadas 3T3-L1 son modelos experimentales de uso común. Como ocurre con todas las células primarias, la alta variabilidad, las bajas tasas de proliferación, el alto coste y los problemas con la disponibilidad de tejido fresco, limitan el uso de adipocitos primarios. La línea celular de adipocitos 3T3-L1 se ha utilizado como modelo para determinar los mecanismos antidiabéticos y la eficacia de los extractos de plantas para la resistencia a la insulina <sup>15</sup>.

En resumen, los hepatocitos, células del músculo esquelético y adipocitos nos permiten estudiar su papel en el metabolismo de la glucosa y de los lípidos, y ensayar fármacos para tratar la DM2.

### 1.2. Modelos in vitro de diabetes en el embarazo

En primer lugar, es importante distinguir entre diabetes pregestacional y diabetes gestacional. La diabetes pregestacional es aquélla que está presente antes de la gestación y puede ser DM1 o DM2. La influencia de los dos tipos de diabetes sobre el embarazo se correlaciona con la duración de la enfermedad y, sobre todo, con la presencia de complicaciones. La diabetes gestacional se define por la Organización Mundial de la Salud como la hiperglucemia diagnosticada por primera vez durante la gestación.

La diabetes confiere un alto riesgo a la gestación. La diabetes pregestacional se asocia a un mayor riesgo de malformaciones fetales y abortos, muy relacionados con el grado de control glucémico. A lo largo del embarazo, las mujeres con diabetes presentan más riesgo de hipertensión gestacional, preeclampsia y polihidramnios. Respecto al recién nacido, aparecen complicaciones como: hipoglucemia, hiperbilirrubinemia, hipocalcemia, policitemia, síndrome de distrés respiratorio y cardiomiopatía; además de la morbilidad asociada al parto pretérmino, retraso del crecimiento intrauterino, macrosomía o malformaciones congénitas. Algunas de estas complicaciones pueden estar mediadas por la placenta. El ambiente diabético

expone a la placenta a cambios morfológicos y funcionales a nivel celular y tisular, que pueden producir profundos efectos en su desarrollo y función durante la gestación. La placenta humana está formada por tres poblaciones principales de trofoblastos: citotrofoblastos (CT), citotrofoblastos extravellosos y sincitiotrofoblastos. A continuación, se describen varios modelos y líneas celulares disponibles para investigar el efecto de la DM en la placenta, y modelos *in vitro* de cultivos embrionarios para estudiar el efecto de la diabetes en su desarrollo<sup>16</sup>.

### a) Líneas celulares primarias de origen placentario

Las líneas celulares primarias de origen placentario pertenecen a las fases de gestación temprana o a término. Algunas de ellas se han utilizado para estudiar diferentes aspectos de la función del trofoblasto, como la invasión, la migración y la inmunología. Hay autores que las han utilizado para estudiar la asociación entre el metabolismo de los lípidos maternos y la DMG<sup>17</sup>.

Durante la implantación del blastocisto se forman nuevos tipos de células trofoblásticas diferentes, llamadas el trofoblasto velloso (TV) y extravelloso (TEV). Los trofoblastos vellosos (TV) primarios forman el árbol velloso que es bañado por la sangre materna en el espacio intervelloso y participan en los intercambios entre el feto y la madre. Se ha estudiado el efecto de los ácidos grasos libres palmitato y oleato, sobre la viabilidad y la función de estos trofoblastos en cultivo 18; y, específicamente, para comprender el efecto de la obesidad materna antes del embarazo en la DMG y en la preeclampsia y las complicaciones en el feto de esta última. Estudios similares investigan el efecto de IL-6 y TNF-α (elevado en GDM y obesidad) sobre la acumulación de ácidos grasos en el cultivo de células de trofoblasto primario humano 19.

No obstante, las células primarias tienen algunas limitaciones, como un número relativamente bajo de células aisladas, una vida útil corta y la falta de proliferación *in vitro*. Para superar estas limitaciones, se han establecido varias líneas celulares trofoblásticas utilizando dos métodos: el establecimiento de líneas celulares de coriocarcinoma humano, y la introducción del gen que codifica el antígeno grande T40 del poliomavirus simio (SV40T).

### b) Células de coriocarcinoma

A pesar de ser un modelo de células cancerosas, las células de coriocarcinoma se usan ampliamente para estudiar la función de la placenta. Las ventajas de estas células son: facilidad de cultivar y







propagar, capacidad de barrera, expresión de los transportadores de glucosa (GLUT-1, GLUT-3) y liberación de hormonas. Entre ellas se incluyen: BeWo, JAR y Jeg-3. También hay células de coriocarcinoma AC-1 fusionadas con células de trofoblasto del primer y tercer trimestre, como son las ACH-3P y AC1-M59.

Estas células se han utilizado bastante como modelos *in vitro*; sin embargo, presentan diferencias relevantes con respecto a los trofoblastos primarios, como es la distinta expresión de HLA (*human leucocyte antigens*) de estas células que pueden tener repercusiones funcionales. Además, los estudios en metilación del ADN muestran una alta variabilidad que produce perfiles de expresión diferencial. Por lo tanto, para interpretar los resultados obtenidos con células de coriocarcinoma debía compararse con los obtenidos con células primarias<sup>20</sup>.

### c) Células inmortalizadas humanas

Una de las líneas celulares inmortalizadas humanas más utilizadas es la línea celular de trofoblasto extravelloso (TEV) del primer trimestre humano (HTR-8/SVneo). Esta línea se desarrolló a partir del TEV del primer trimestre infectándolo con SV40T. Contiene dos poblaciones de células que sugieren la presencia de trofoblasto y células estromales/mesenquimales. Las células HTR-8/SVneo se utilizan en gran medida para estudiar las funciones del trofoblasto durante la fusión celular, la migración y la invasión durante la hiperglucemia<sup>21</sup>.

Las células HTR-8/SVneo se usan también para estudiar los perfiles de expresión de micro-ARN en condiciones de glucosa alta. Como ejemplos está la evaluación de la influencia de miR-137 en la viabilidad y migración del trofoblasto en condiciones de alto contenido de glucosa; estudios sobre el efecto combinado de glucosa y ácidos grasos en la implantación temprana; para determinar los efectos de la hipoxia en la implantación y el papel de la glucosa y sus transportadores<sup>22</sup>.

Una de las ventajas más relevantes de estas células es la disponibilidad ilimitada y por tanto la reproducibilidad de los experimentos, convirtiéndolas en modelo de elección en investigación. Sin embargo, como muchas otras líneas celulares, las HTR8/SVneo difieren de los trofoblastos primarios en algunos aspectos y puede que en ocasiones no reflejen con precisión las propiedades del trofoblasto.

### d) Células madre del trofoblasto humano

Recientemente, se ha desarrollado un sistema de cultivo para generar células madre de trofoblasto humano a partir de blastocistos y placentas tempranas. Estas células son genéticamente estables y pueden usarse potencialmente para el estudio del desarrollo y función de la placenta <sup>16</sup>.

Las células madre del trofoblasto humano parecen prometedoras para evaluar la influencia de la DM en el desarrollo y la función del trofoblasto, pero necesitan más estudios para caracterizar completamente el modelo.

### e) Organoides de placenta

Existe la posibilidad de generar esferoides de trofoblasto extravelloso mediante el cultivo de células HTR8/SVneo EVT en placas de muy baja adherencia, usados como modelo de invasión de trofoblasto extravelloso. Pero, recientemente, se han generado organoides de trofoblastos que modelizan las interacciones materno-fetales. Estos estudios muestran cómo generar organoides de placenta de primer trimestre de embarazo de las semanas 6a-9a ó 6a-7a. Estos organoides presentan un alto valor para el estudio in vitro de cómo afectan al desarrollo y función de la placenta situaciones patológicas como la DM<sup>23</sup>. Los nuevos organoides de trofoblastos derivados de muestras humanas abren nuevas oportunidades para modelizar las interacciones materno-fetales que son de gran interés y profundizarán nuestro conocimiento de cómo las placentas se desarrollan en las mujeres con DM. Sin embargo, estos modelos tienen sus limitaciones pues sólo reflejan el componente de trofoblasto de la placenta, por lo que, serán necesarios otros estudios que incluyan métodos de bioingeniería que generen organoides que representen fielmente a la placenta.

### f) Cultivos embrionarios

La DM materna se asocia con un retraso en el desarrollo embrionario preimplantacional en modelos de ratón, debido a la apoptosis y a cambios en su estado metabólico. El desarrollo preimplantacional discurre desde la fecundación hasta la implantación del embrión en el útero. Durante este periodo se producen dos decisiones de destino celular dando lugar a tres poblaciones celulares. En la primera decisión, las células se diferencian en trofectodermo (TE) o células de la masa celular

# **IN VITRO**

interna (MCI). Las células descendientes del TE formarán la placenta embrionaria, mientras que las de la MCI deciden en diferenciarse en epiblasto (Epi) o endodermo primitivo (EPr). Las células del Epi formarán principalmente el embrión propiamente dicho, mientras que las células del EPr generan el endodermo del saco vitelino<sup>24</sup>.

Para investigar el efecto del ambiente intrauterino de madres diabéticas en el desarrollo preimplantacional, se pueden cultivar los embriones *in vitro* en altas concentraciones de glucosa. Este método permite estudiar defectos tempranos del desarrollo sin tener que inducir DM en las madres. Si se cultivan embriones de ratón en presencia de altos niveles de glucosa, se reduce el número total de células del embrión, así como de células del TE en estadío de blastocisto, y también hay defectos en la decisión de destino de las células de la MCI<sup>25</sup>.

Un modelo alternativo para estudiar el efecto de altas concentraciones de glucosa durante el desarrollo embrionario temprano es el uso de blastoides y organoides de la MCI. Los blastoides son estructuras que se asemejan morfológica y transcripcionalmente a los blastocistos y se generan a partir de células madre del trofoblasto y embrionarias. Los organoides de la MCI son esferoides tridimensionales generados a partir de células madre embrionarias modificadas de ratón que reproducen la decisión de destino celular a Epi o EPr. En este contexto, ambos modelos se podrían emplear para reemplazar el uso de ratones *in vivo*. Para ello, estas células se podrían cultivar en presencia de altas concentraciones de glucosa y caracterizar los defectos y causas que resultan en la poca calidad de los embriones de madres diabéticas<sup>26</sup>.

### 2. El entorno experimental

Para reproducir el ambiente diabético, después de elegir el modelo celular que más se ajuste a nuestro estudio, debemos recrear las condiciones adecuadas y lo más parecidas a las que se dan en un ser vivo con diabetes. Esto nos permitirá estudiar el efecto de la DM en las células  $\beta$ , los islotes pancreáticos, etc. e incluso en el desarrollo y fisiología de la placenta y del embrión.

Como se mencionó anteriormente, la DM se define por concentraciones de glucosa en plasma—en ayunas—por encima de 126 mg/dl, o concentraciones de glucosa aleatorias por encima de 200 mg/dl; siendo los límites aún más bajos para la DMG². En cuanto a reproducir el ambiente diabético de DM2, hay que tener en cuenta tanto las concentraciones de glucosa como las concentraciones de ácidos grasos.

Sin embargo, las concentraciones utilizadas en investigación para imitar la diabetes *in vitro* no siempre son consistentes. La mayoría de los autores están de acuerdo en las concentraciones para imitar, pero hay que otros que usan 126 mg/dl<sup>30</sup>, 180 mg/dl<sup>31</sup> o incluso 198 mg/dl de glucosa<sup>22</sup>. Para simular condiciones de diabetes, se usan diferentes concentraciones: 360 mg/dl, 396 mg/dl, pero es 450 mg/dl la concentración de glucosa más frecuentemente utilizada, o incluso también 639 mg/dl<sup>22,277,28,30,32</sup>.

En cuanto a las condiciones prediabéticas, las concentraciones elegidas son 180 mg/dl y 198 mg/dl de glucosa. Todos estos autores consideran como normoglucemia 100 mg/dl de glucosa 27-29.

En el caso del cultivo de embriones con niveles altos de glucosa existe cierta controversia sobre la concentración en el tracto reproductivo donde se desarrollan los embriones, y la concentración que proporciona un desarrollo óptimo cuando éstos se cultivan *in vitro*; por lo tanto, los diferentes estudios emplean concentraciones crecientes de glucosa en su medio de cultivo. Mientras que en condiciones control se emplea una concentración de 0,2 mM de glucosa, en condiciones experimentales se usa hasta una concentración de 52 mM; pero la mayor parte de estudios emplean de 15 a 27 mM, que es 2-3 veces más que la hallada en suero de ratones no diabéticos<sup>25</sup>.

Respecto a los modelos de DM1, para crear su entorno experimental (independientemente del modelo elegido) hay que tener en cuenta otro componente importante, el inmunológico. Existen combinaciones específicas de citocinas inflamatorias IL-1β, IL-6, IFN-γ y TNF-α que muestran un efecto citotóxico sinérgico sobre la célula β, induciendo mecanismos apoptóticos. La exposición a IL-1β, IFN-γ y/o a TNF-α de las células β, conduce a la apoptosis por varios mecanismos: el estrés del retículo endoplasmático (RE), la liberación de señales de muerte (death signals) de las mitocondrias, fragmentación en el ADN, etc. Estos mecanismos siguen sin estar claros, por lo que existen varios estudios que cultivan in vitro diferentes líneas celulares de rata, ratón y humano en presencia de diferentes cantidades de estas citoquinas. Gracias a ellos, se ha demostrado por ejemplo, que la IL-1β es un contribuyente importante a la destrucción autoinmune de las células β en DM1, y recientemente se ha relacionado con el desarrollo de DM2<sup>33</sup>. Además, se vio que la sobreexpresión de IGF2 confiere protección contra la apoptosis de las células  $\beta$  inducida por IL-1 $\beta$ , cuando se cultivaban las células con bajas concentraciones de IL-1  $\beta^{33}$ .







En cuanto a la IL-6, se sabe que los niveles circulantes están elevados en pacientes con DM2, pero se debate si tiene un rol en la patogénesis de la DM2. En un estudio muestran que la exposición de células  $\beta$  de rata (INS- 1 o INS-832/13) con IL-6 durante 48 horas puede inducir la muerte de las células  $\beta^{34}$ .

En otro estudio realizado con células productoras de insulina de rata y ratón, islotes pancreáticos humanos y células EndoC- $\beta$ H1 humanas expuestas a IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , se observó que el óxido nítrico juega un papel clave en el estrés del RE inducido por citoquinas en islotes de ratas, pero no en los de ratones o humanos. Parece que en las personas el estrés del ER inducido por citoquinas contribuye a la muerte de las células  $\beta$ , al menos en parte a través de la activación de enzimas quinasas JNK $^{35}$ .

Se ha identificado la inflamación crónica de bajo grado como un factor común de la obesidad, la resistencia a la insulina y la DM2. De hecho, los tejidos de personas obesas están fuertemente infiltrados por células inmunes inflamatorias (por ejemplo, monocitos, macrófagos, células Th1). Estas células interactúan con los adipocitos para desencadenar una inflamación crónica que genera resistencia a la insulina en los propios adipocitos, lo que conduce a la DM2. La gran mayoría de la investigación básica sobre DM2, incluida la interacción adipocitos-leucocitos, se ha realizado en modelos animales. Sin embargo, hasta la fecha no existen modelos in vitro fisiológicamente relevantes, que ilustren la interacción entre el sistema adiposo y el sistema inmunitario que pudiesen conducir a una extrapolación precisa de la DM2. Una alternativa, es utilizar cultivos de células humanas primarias (adipocitos o células inmunitarias) en sistemas estáticos (por ejemplo, placas de cultivo de tejidos)<sup>36</sup>. Ciertos autores han desarrollado un sistema de co-cultivo de microfluidos

compartimentados en un chip específico, que proporciona una tasa constante de suministro de nutrientes y eliminación de desechos, asemejandose a las redes microvasculares del entorno *in vivo*. La línea celular U937 es un linfoma de histiocitos humano usado como modelo de monocitos que responde a diversos estímulos, adoptando la morfología y características de macrófagos. El co-cultivo de células U937 con adipocitos permite la interacción paracrina que hace que los adipocitos desarrollen resistencia a la insulina. Este sistema se puede utilizar para estudiar los mecanismos asociados a la obesidad, la resistencia a la insulina y la DM2<sup>37</sup>. Otros componentes implicados en la aparición de la RI y la aparición de la DM2 que pueden ser considerados en estos sistemas *in vitro* son: el TNFa, la hipoxia, la dexametasona y altas concentraciones de insulina<sup>14</sup>.

Por otro lado, para simular altas concentraciones de ácidos grasos de la DM2, los dos ácidos grasos dietéticos más empleados por los autores son el palmitato y el oleato. Se ha demostrado que el palmitato es tóxico para el trofoblasto humano, pero el oleato no 18, por lo que el primero se utiliza, principalmente, para estudiar el efecto de los ácidos grasos en la placenta y el segundo en el desarrollo del feto. El palmitato es también el más utilizado para estudiar los efectos de los ácidos grasos en la fisiología de las células β y el páncreas. La mayoría de los autores utilizan una concentración de 100 µM<sup>17,18,32</sup>, aunque también se ha utilizado 500 µM. En cuanto a los ensayos realizados con líneas celulares de hepatocitos y musculares hay autores que usan 125 µM, y otros sin embargo usan 250 µM de palmitato12. Estos datos muestran que en muchos casos existe una falta de consenso entre los autores, y si se estableciesen criterios comunes en la metodología in vitro, se podría mejorar la reproducibilidad de los resultados.

Tabla 2.- Modelos in vitro y condiciones experimentales según los objetivos del estudio.

Objetivos	Células	Entorno experimental	
Estudio de la biología de células β (respuesta a glucosa y secreción de insulina) y ensayo de fármacos	Líneas celulares animales (BRIN-BD11, INS1) Líneas celulares humanas (NAKT-15, 1.1B4, EndoC- βH1, βH2 y βH3)	Adición de glucosa y citoquinas: IL–1β, IL-6, IFN-γ, TNF-α para DM1	
Estudio de la biología del páncreas endocrino y desarrollo de fármacos y medidas preventivas	Islotes pancreáticos Células madre humanas Cultivo de organoides pancreáticos	Adición de glucosa y factores de crecimiento	
Estudio de la resistencia a la insulina	Cultivo de hepatocitos Cultivo de células de músculo esquelético Cultivo de tejido adiposo	Adición de glucosa, ácidos grasos e insulina	
Estudio del metabolismo de los lípidos maternos y la obesidad materna	Líneas celulares primarias de origen placentario	Adición de glucosa y de ácidos grasos	
Estudio del efecto de citocqunas y ácidos grasos		Adición de glucosa, ácidos grasos y citoquinas	
Estudio sobre la expresión génica y regulación epigenética	Células inmortalizadas humanas: (HTR-8 / SVneo)	Adición de glucosa y ácidos grasos	
Estudio de las funciones del trofoblasto y desarrollo de la placenta	Células madre del trofoblasto humano Organoides de placenta		
Estudio del efecto del ambiente intrauterino en el desarrollo embrionario	Cultivos embrionarios	Adición de glucosa y ácidos grasos	

# IN VITRO

### CONCLUSIONES

La diabetes es una enfermedad compleja y ningún modelo *in vitro* podrá reproducir todos los aspectos que ocurren *in vivo*. Es importante decidir qué queremos estudiar antes de optar por un modelo u otro, con un ambiente/exposición determinado. Asimismo, en muchos casos, se recomendaría usar varios modelos *in vitro* en paralelo para poder comparar los resultados obtenidos.

En cuanto al objetivo de estudio, si éste está centrado en estudiar la biología de células  $\beta$  (respuesta a glucosa y secreción de insulina), podremos elegir entre líneas celulares animales (p. Ej. BRIN-BD11, INS1) y humanas (p. Ej. NAKT-15, 1.1B4, EndoC- $\beta$ H1, EndoC- $\beta$ H2, EndoC- $\beta$ H3). Para imitar el entorno experimental de la DM1 y DM2 se tendrá en cuenta la concentración de glucosa y de ácidos grasos, y además para la DM1, la adición de IL-1 $\beta$  e IFN-y.

Si nos interesa conocer la biología del páncreas endocrino se podría escoger entre islotes pancreáticos, células madre humanas y/o cultivo de organoides pancreáticos. En este caso, hay que tener en cuenta las condiciones de glucosa y la adición de factores de crecimiento para recrear las condiciones diabéticas.

En cuanto al estudio de la sensibilidad/resistencia a la insulina que se produce en la DM2, los cultivos idóneos serían el cultivo de hepatocitos, células de músculo esquelético y/o cultivos de tejido adiposo, en concentraciones adecuadas de glucosa, ácidos grasos e insulina.

Con respecto a la diabetes asociada a la gestación, ya sea pregestacional o gestacional, hay que tener en cuenta si se quieren estudiar los efectos de la diabetes en el desarrollo y función de la placenta, o directamente en el desarrollo del embrión. Como se ha descrito anteriormente, existen varios modelos y líneas celulares disponibles para investigar el efecto de la DM en la placenta, y la elección de cada una dependerá del objetivo. En concreto, las líneas celulares primarias de origen placentario se pueden utilizar para estudiar la asociación entre el metabolismo de los lípidos maternos, la obesidad materna y la diabetes asociada a la gestación. Las células se tendrán que cultivar teniendo en cuenta las concentraciones de glucosa y de ácidos grasos. Además, estas células se podrán utilizar como modelo in vitro para estudiar el efecto de citoquinas (elevadas en DMG y obesidad) sobre la acumulación de ácidos grasos en cultivo de trofoblasto primario humano. En este caso, además de tener en cuenta las cantidades de glucosa y ácidos grasos del medio, se tendrán que añadir citoquinas al medio. Durante el embarazo, la placenta está expuesta a diversos cambios, por lo que es

interesante estudiar la influencia de la diabetes sobre la expresión génica, regulación epigenética, las funciones del trofoblasto y desarrollo de la placenta. Para su estudio, existen varios modelos celulares como las células inmortalizadas humanas: línea celular de trofoblasto extravelloso (TEV) del primer trimestre humano (HTR-8/SVneo), células madre del trofoblasto humano y los organoides de placenta. En cambio, si nuestro objetivo está centrado en investigar el efecto del ambiente intrauterino de madres diabéticas en el desarrollo embrionario, se tendrá que elegir cultivos embrionarios. En todos los casos se tendrán en cuenta las concentraciones de glucosa y ácidos grasos del medio.

En resumen, en este artículo se ha recogido una amplia selección de modelos *in vitro* que existen para estudiar la diabetes y la diabetes asociada a la gestación. También se han detallado las condiciones ensayadas por diversos autores para imitar el ambiente diabético y que puedan ayudar a los investigadores que quieran reproducir estas condiciones en el futuro. Además, ha quedado patente que el desarrollo de modelos *in vitro* para el estudio de la diabetes está en auge. La investigación en este campo es imprescindible, y puede permitir en el futuro reducir la cantidad de animales usados en experimentación, o incluso en algunos casos, reemplazar el uso de animales por modelos *in vitro*.

### **BIBLIOGRAFÍA**

- 1. Jos, Á. *Presente y futuro de los modelos experimentales in vitro*. Rev. Anim. Lab. 2020;84:55-9.
- American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus, ADA Clinical Practice Recommendations. Diabetes Care. 2013;36(1):67-74.
- 3. Zhou Q. and Melton D.A. Pancreas regeneration. Nature. 2018;351-8.
- Hart N.J. and Powers A.C. Use of human islets to understand islet biology and diabetes: progress, challenges and suggestions. Diabetologia. 2019;62(2):212-22.
- Amirruddin N.S., Low B.S.J., Lee, K.O., et al. New insights into human beta cell biology using human pluripotent stem cells. Semin. Cell Dev. Biol. 2020;103:31-40.
- 6. Balboa D., Saarimäki-Vire J., and Otonkoski T. *Concise Review: Human Pluripotent Stem Cells for the Modeling of Pancreatic*  $\beta$ -Cell Pathology. Stem Cells. 2019;37:33-41.
- 7. Lee J., Sugiyama T., Liu Y., et al. Expansion and conversion of human pancreatic ductal cells into insulin-secreting endocrine cells. Elife. 2013:19:2.



INVIERNO 2021 / NÚMERO 88

- 8. Loomans C.J.M., Williams Giuliani N., Balak J., et al. Expansion of Adult Human Pancreatic Tissue Yields Organoids Harboring Progenitor Cells with Endocrine Differentiation Potential. Stem Cell Reports. 2018;10:712-24.
- 9. Green A.D., Vasu S., McClenaghan N.H., et al. Pseudoislet formation enhances gene expression, insulin secretion and cytoprotective mechanisms of clonal human insulin-secreting 1.1B4 cells. Pflügers Arch. Eur. J. Physiol. 2015;467:2219-28.
- 10. Kojima, N. *In vitro reconstitution of pancreatic islets.* Organogenesis. 2014;10:225-30.
- 11. Gómez-Lechón M.J., Donato M.T., Martínez-Romero A., et al. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. Chem. Biol. Interact. 2007;165:106-16.
- 12. Liu L., Zhang X., Chen F., et al. The establishment of insulin resistance model. Cell Rep. 2013;17:5(1).
- 13. Yuasa T., Amo K., Ishikura S., et al. Development of in vitro model of insulin receptor cleavage induced by high glucose in HepG2 cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2014;445:236-43.
- 14. Lo K.A., Labadorf A., Kennedy N.J., et al. Analysis of In Vitro Insulin-Resistance Models and Their Physiological Relevance to InVivo Diet-Induced Adipose Insulin Resistance. Cell Rep. 2013;5:259-70.
- 15. Lankatillake C., Huynh T., and Dias D.A. *Understanding glycaemic control* and current approaches for screening antidiabetic natural products from evidence-based medicinal plants. Plant Methods. BioMed Central Ltd. 2019;7;15:105.
- Okae H., Toh H., Sato T., et al. Derivation of Human Trophoblast Stem Cells. Cell Stem Cell. 2018;22:50-63.
- 17. Stirm L., Kovářová M., Perschbacher S., et al. BMI-Independent Effects of Gestational Diabetes on Human Placenta. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2018;103:3299-309.
- 18. Colvin B.N., Longtine M.S., Chen B., et al. Oleate attenuates palmitateinduced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in placental trophoblasts. Reproduction. 2017;153:369-80.
- 19. Lager S., Jansson N., Olsson A. L., et al. Effect of IL-6 and TNF-α on fatty acid uptake in cultured human primary trophoblast cells. Placenta. 2011;32:121-7.
- 20. Apps R., Sharkey A., Gardner L., et al. Genome-wide expression profile of first trimester villous and extravillous human trophoblast cells. Placenta. 2011;32:33-43.
- 21. Wu L., Song W., Xie Y., et al. miR-181a-5p suppresses invasion and migration of HTR-8/SVneo cells by directly targeting IGF2BP2. Cell Death Dis. 2018;9:16.
- 22. Peng H.Y., Li M.Q., and Li H.P. High glucose suppresses the viability and proliferation of HTR 8/SVneo cells through regulation of the miR 137/PRKAA1/IL 6 axis. Int. J. Mol. Med. 2018;42:799-810.

- 23. Turco M.Y., Gardner L., Kay R.G., et al. Trophoblast organoids as a model for maternal–fetal interactions during human placentation. Nature. 2018;564 (7735):263-7.
- 24. Bassalert C., Valverde-Estrella L., Chazaud C. et al. Primitive Endoderm Differentiation: From Specification to Epithelialization. Curr. Top. Dev. Biol. 2018;128:81-104.
- 25. Bermejo-Alvarez P., Roberts R.M., and Rosenfeld C.S. *Effect of glucose concentration during in vitro culture of mouse embryos on development to blastocyst, success of embryo transfer, and litter sex ratio.* Mol. Reprod. Dev. 2012;79:329-36.
- Mathew B., Muñoz-Descalzo S., Corujo-Simon E., et al. Mouse ICM Organoids Reveal Three-Dimensional Cell Fate Clustering. Biophys. J. 2019;116:127-41.
- 27. Yung H., Alnæs-Katjavivi P., Jones C.J.P., et al. Placental endoplasmic reticulum stress in gestational diabetes: the potential for therapeutic intervention with chemical chaperones and antioxidants. Diabetologia. 2016;59:2240-50.
- 28. Han C.S., Herrin M.A., Pitruzzello M.C., et al. Glucose and Metformin Modulate Human First Trimester Trophoblast Function: a Model and Potential Therapy for Diabetes-Associated Uteroplacental Insufficiency. Am. J. Reprod. Immunol. 2015;73:362-71.
- 29. Heim K.R., Mulla M.J., Potter, J.A., et al. Excess glucose induce trophoblast inflammation and limit cell migration through HMGB1 activation of Toll-Like receptor 4. Am. J. Reprod. Immunol. 2018;80:e13044.
- 30. Li G., Lin L., Wang Y., et al. 1,25(OH)2D3 Protects Trophoblasts Against Insulin Resistance and Inflammation Via Suppressing mTOR Signaling. Reprod. Sci. 2019;26:223-32.
- 31. Jiang S., Teague A.M., Tryggestad J.B., et al. Role of microRNA-130b in placental PGC-1a/TFAM mitochondrial biogenesis pathway. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2017;487:607-12.
- 32. Triñanes J., Rodriguez-Rodriguez A.E., Brito-Casillas, Y., et al. Deciphering Tacrolimus-Induced Toxicity in Pancreatic β Cells. Am. J. Transplant.2017;17:2829-40.
- 33. Estilles E., Téllez N., Soler J., et al. High sensitivity of β-cell replication to the inhibitory effects of interleukin-1β: Modulation by adenoviral overexpression of IGF2 in rat islets. J. Endocrinol. 2009;203:55-63.
- Oh Y.S., Lee Y.J., Park E.Y., et al. Interleukin-6 treatment induces beta-cell apoptosis via STAT-3-mediated nitric oxide production. Diabetes. Metab. Res. Rev. 2011;27:813-9.
- 35. Brozzi F., Nardelli T.R., Lopes M., et al. Cytokines induce endoplasmic reticulum stress in human, rat and mouse beta cells via different mechanisms. Diabetologia. 2015;58:2307-16.
- 36. Huh D., Hamilton G.A., and Ingber D.E. From 3D cell culture to organs-on-chips. Trends Cell Biol. 2011;21(12):745-54.
- 37. Liu Y., Kongsuphol P., Chiam S.Y., et al. Adipose-on-a-chip: a dynamic microphysiological in vitro model of the human adipose for immune-metabolic analysis in type Il diabetes. Lab Chip. 2019;19:241-53.

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.



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 **GPHV** con integrado.













**MMM Group** 

bmt@bmtiberia.es www.bmtiberia.es









**ANIMALES DE LABORATORIO** 

INVIERNO 2021 / NÚMERO 88

# Alojamiento de conejos en el suelo: mejora en el bienestar animal y ventajas económicas

Elisabet Tetas Casals, Eva Cepeda, Albert Visa, Adrián Jegú y Paco Pérez https://www.sybasl.com/

Palabras clave: suelo, conejos, corralina.

### INTRODUCCIÓN

El centro usuario de animales de experimentación Seguridad y Bienestar Animal S.L. es una organización de investigación por contrato (CRO) certificada para el cumplimiento de Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) que presta servicios a la industria farmacéutica y agroalimentaria, y resuelve cualquier necesidad relacionada con los animales de experimentación.

Las especies habituales de trabajo en el centro habían sido, hasta la fecha: pollos, pavos, cerdos, pequeños rumiantes y bovinos, especies de destino más habituales de los estudios preclínicos y clínicos principalmente desarrollados en el centro. En el último año, sin embargo, se han venido realizando varios proyectos de distinta naturaleza en conejos –una especie con la que se había trabajado esporádicamente– que han permitido ampliar el conocimiento sobre la especie y perfeccionar el bienestar de los animales (pilar fundamental del centro), su manejo y facilitar al equipo la práctica diaria.

Los más de 10 años de experiencia del centro en el alojamiento de cobayos en suelo han supuesto el punto de partida para aplicar esta práctica a los estudios en conejos, la cual ha resultado clave en la mejora del bienestar y el manejo.

Este procedimiento fue aprobado por la Generalitat de Catalunya y la supervisión del bienestar fue llevada a cabo por el veterinario designado y el Comité de Ética de Seguridad y Bienestar Animal S.L.

Como valor añadido, estas mejoras han repercutido positivamente en el coste económico del estudio, ya que han permitido reducir gastos de manera significativa.

### ALOJAMIENTO EN RACKS

El primer grupo de animales, formado por 30 hembras de entre 3-4 meses, fue alojado conservando los grupos de 3 animales que convivían en origen. Cada grupo de 3 animales fue alojado en un rack formado por 2 jaulas unidas, ocupando un total de 20 jaulas, en una misma sala experimental (ver Figura 1).



Figura 1.- Grupo de tres conejas alojadas en racks.

Este tipo de alojamiento, en un principio ventajoso para el estudio en cuestión, fue evidenciando algunas carencias.

### Higiene de los animales

Uno de los problemas detectados fue la falta de higiene de los animales. Las superficies de las jaulas, de plástico e inox,

quedaban impregnadas de orines y heces. El personal dedicaba un mínimo de 4 horas diarias al mantenimiento de la sala, principalmente limpiando los slats en contacto con los animales, aspirando las bolas de pelo y eliminando las heces pegadas a la superficie, en contacto con los animales.

A pesar del esfuerzo por mantener el espacio limpio, con el tiempo, el pelaje de las conejas iba quedando húmedo y amarillento (ver Figura 2), sobre todo en las partes bajas y los costados.



Imagen suministrada por la au

Figura 2.- Coneja alojada en rack con el pelaje amarillento.

Transcurridos unos 50 días desde la llegada de los animales, se observó el desarrollo de pododermatitis plantar de grado 1-2 (clasificación Mancinelly)¹ en al menos una extremidad de 5 conejas (16,7% de los animales). Esta patología, de carácter crónico y multifactorial, es frecuentemente asociada a condiciones de estabulación intensivas. Ocurre cuando los animales son confinados en espacios pequeños con superficie de apoyo dura o de rejilla de alambre. El trauma debido al contacto persistente con dicho suelo puede provocar isquemia y necrosis avascular de la planta del pie². Dichos animales requirieron cuidados y tratamiento adicional para evitar el avance de la lesión (ver Figura 3).

### Inestabilidad social

El segundo inconveniente se observó al entrar en edad reproductiva, lo cual desencadenó comportamientos de dominancia en algunos individuos, provocando la inestabilidad de los grupos<sup>3</sup>. Los elementos de enriquecimiento ambiental proporcionados (bastones de madera, rollos de cartón, heno y vegetales frescos a diario) no fueron medidas suficientes para la reducción de estas conductas en todos los grupos. Se observaron

peleas, comportamientos de dominancia frente a comederos y bebederos, pérdida de peso e incluso lesiones físicas, como arañazos y mordiscos, en un 10% de los grupos.



Imagen suministrada por la autoría

Figura 3.- Inicio de lesión podal por alojamiento en rack.

En un intento de minimizar los efectos negativos de este comportamiento, se identificaron las conejas más dominantes (un total de 3) y se separaron en jaulas individuales, siempre dentro de la misma sala y manteniendo el contacto visual y olfativo con los demás animales. Con esta medida, se incrementaron las jaulas ocupadas en un 15%, pasando de 20 a 23 jaulas.

Durante la observación diaria de los animales se detectaron signos de inactividad y el desarrollo de comportamientos anormales para la especie descritos por varios autores<sup>4</sup>, como rascado de las paredes o roído de barrotes, en el 100% de las conejas individualizadas y en el 40% de las conejas en grupo.

### ALOJAMIENTO EN SUELO COMO MEDIDA PARA MEJORAR LAS ALTERACIONES FÍSICAS Y CONDUCTUALES OBSERVADAS

Tras meses de experiencia trabajando con esta especie, y siguiendo recomendaciones en materia de bienestar<sup>5</sup>, se decidió apostar por un alojamiento en el suelo. El siguiente grupo de 30 conejas fue alojado en una sala experimental equipada con 4 corralinas para 7-8 individuos.

**ANIMALES DE LABORATORIO** 

INVIERNO 2021 / NÚMERO 88

Aunque se planteaban algunas dudas en varios aspectos, como conseguir grupos socialmente harmoniosos o la facilidad en el manejo, la mejora en el bienestar parecía evidente (ver Figura 4).



Imagen suministrada por la autoría

Figura 4.- Grupo de conejas alojadas en suelo.

Este tipo de alojamiento, por una parte, permitió añadir más elementos de enriquecimiento ambiental: las corralinas se proveyeron de cajas para simular el nido, que también sirvieron de plataformas, y vallas separadoras de madera para proporcionar diferentes espacios dentro del mismo corral (como sugieren algunos autores)<sup>6</sup>. La cama de viruta, por otro lado, además de fomentar la conducta de escarbar, mantenía los suelos secos y las conejas conservaban el pelaje limpio en su totalidad (ver Figura 5). Además, no se observaron lesiones plantares en ninguna de las 30 conejas alojadas en suelo (ver Figura 6).



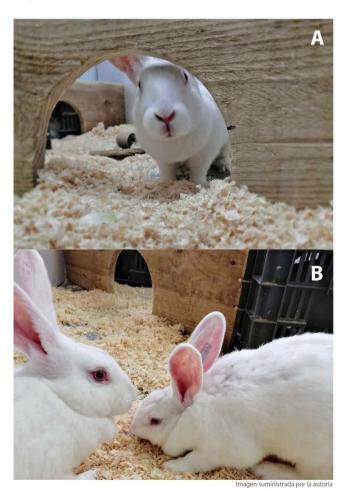
Figura 5.- Pelaje limpio de una coneja alojada en suelo.



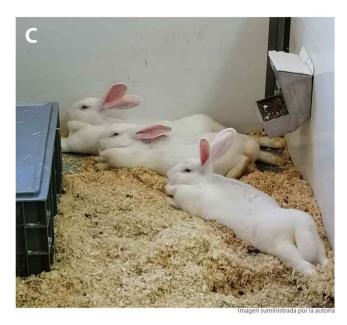
Figura 6.- Aspecto de la superficie plantar de una coneja alojada en suelo.

Pasado el período de aclimatación, los animales se mostraron notablemente activos, interaccionando más entre ellos y con el entorno, y mostrando patrones conductuales naturales de la especie<sup>7</sup>: saltar, correr, perseguirse, sentarse con las orejas erguidas, cavar, no observados en los conejos en jaulas.

El único contratiempo detectado fue una diferencia en el incremento de peso entre individuos de una corralina en particular. Durante 3 semanas consecutivas, algunos animales aumentaron de peso, aparentemente a expensas de otros animales del grupo. La adición de un comedero y una valla separadora extra (ver Figura 7), creando un espacio adicional, hizo que disminuyera la competencia por la comida y ayudó a estabilizar definitivamente el grupo. Durante los meses que duró el estudio, no se observaron otros problemas de incompatibilidad o agresividad entre animales.



Figuras 7.- A y B. Vallas separadoras dentro de las corralinas.



Figuras 7.- C. Comedero adicional.

Una condición importante del alojamiento en suelo era que no complicara el manejo de los animales y se comprobó que, en efecto, no representaba un punto crítico. La observación grupal de los animales se facilitaba, ya que, al estar en un mismo nivel, aumentaba notablemente el campo visual del observador, respecto a los racks.

Los cuidadores pasaron a destinar unas 1-2 horas diarias a tareas de mantenimiento, frente a las 4-5 horas invertidas en los racks, por lo que pudieron dedicar más tiempo a interaccionar con los animales, lo que permitió crear vínculos de confianza con ellos<sup>6</sup>. Durante las manipulaciones habituales, como, por ejemplo, pesajes semanales o extracciones de sangre periódicas, los animales se mostraron menos estresados que sus compañeros en racks. Así, tareas rutinarias que implicaban la manipulación de los animales dentro del estudio se hicieron mucho más llevaderas, tanto para el personal como para los animales.

### **VENTAJAS ECONÓMICAS**

Las mejoras no sólo se observaron en el terreno del bienestar animal, sino que también fueron económicas. Por un lado, el sistema en suelo redujo el coste del material necesario para el mantenimiento un 20% respecto al sistema en racks (viruta vs papel absorbente, y productos de limpieza); por otro lado, las horas destinadas al mantenimiento diario de la sala disminuyeron a más de la mitad, aproximadamente.

### **ANIMALES DE LABORATORIO**

INVIERNO 2021 / NÚMERO 88

Por último, el equipamiento utilizado en el alojamiento en suelo, material genérico de granja como vallas, comederos o bebederos, es considerablemente más económico que los racks, que al ser equipamiento específico de laboratorio presenta precios más elevados. En este sentido, el ahorro que supone el sistema de alojamiento en suelo también es evidente. En la Tabla 1 se resumen la infraestructura, el material y el personal necesario para cada tipo de alojamiento.

**Tabla 1.-**Comparación infraestructura necesaria según sistema de alojamiento.

	NÚMERO SALAS	EQUIPAMIENTO	MANTENIMIENTO EN HORAS DIARIAS DE PERSONAL	MATERIAL
RACK	1	23 jaulas tipo rack	4-5	Papel de laboratorio absorbente
SUELO	1	4 corralinas	1-2	Viruta libre de sustancias tóxicas

### CONCLUSIONES

Si bien es cierto que no todos los procedimientos son aptos para un sistema de alojamiento de este tipo y que hay que valorar cada caso en particular, la filosofía de Seguridad y Bienestar Animal S.L. es que cualquier iniciativa que implique una mejora del bienestar de los animales y del personal merece ser probada.

En este sentido, el sistema de alojamiento en suelo reveló tanto mejoras en el bienestar de los animales como en la facilidad del manejo, así como una reducción de costes en varios aspectos, características que lo convierten en una alternativa más que interesante frente al alojamiento en racks.

### **BIBLIOGRAFÍA**

- 1. Mancinelli E., Keeble E., Richardson J., et al. Husbandry risk factors associated with hock pododermatitis in UK pet rabbits (Oryctolagus cuniculus). Vet Rec. 2014;174:429.
- Rommers J.M. and Meijerhof R. The effect of different floor types on footpad injuries of rabbit does. Proceedings of the 6th World Rabbit Congress. Toulouse, France. 1996; July: 431-6.
- 3. Verga M., Luzi F., and Carenzi C. Effects of husbandry and management systems on physiology and behavior of farmed and laboratory rabbits. Hormones and Behaviour. 2007;52:122-9.
- Lidfors L. Behavioural effects of environmental enrichment for individually caged rabbits. Applied Animal Behaviour Science. 1997;52:157-69.
- 5. https://www.nc3rs.org National Centre for the Replacement Refinement & Reduction of Animals in Research.
- Hawkins P., Hubrecht R., Buckwell A., et al. Refining rabbit care A resource for those working with rabbits in research. Report from the UFAW/RSPCA Rabbit Behaviour and Welfare Group. 2008. ISBN: 978-0-901098-06-1.
- 7. Love J.A. *Group Housing: Meeting the Physical and Social Needs of the Laboratory Rabbit.* Laboratory Animal Science. 1994;44(1):5-11.

# RED

# WASHERS

¡DESCUBRE TU NUEVA ZONA DE LAVADO!



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



representado por

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





### Descontamina como puedas

Fco. Javier García Palomo

Asesor en Gestión de Riesgo Biológico (IFBA certified profesional)

Palabras clave: COVID-19, biocida, desinfección.

Hemos vivido un año –este pasado 2020 – que si bien debería haber sido el año de la culminación de numerosos proyectos ligados al mayor programa de investigación e innovación en la Unión Europea, con un presupuesto de casi 80 mil millones de euros para el periodo 2014-2020, y cuyo principal objetivo era asegurar la competitividad global de Europa "Horizonte 2020"; parece haberse convertido en el año que todos queremos olvidar y en el que hemos olvidado muchas cosas que ya sabíamos.

El año comenzó con el lejano rumor de un episodio de epidemia en un lugar que quedaba muy lejos y del que, aunque muchos seguíamos con interés desde finales de 2019, ya habíamos visto pasar de largo en otras ocasiones. No nos preocupaba, ya lo habían conseguido contener en otras dos ocasiones; estábamos a salvo. Muchos especialistas del área biosanitaria (yo me incluyo) pensábamos que sólo era uno más, y que no nos afectaría en nuestros cómodos sillones de casa frente al ordenador o la TV. Pero a finales de enero, la cosa empezó a ponerse seria; pese al aparente confinamiento masivo y total del gigante asiático, empezaron a aparecer casos cada vez más cerca de nosotros: Italia, Alemania, Francia... Sólo era cuestión de días o semanas que en España apareciera algún caso.

El primer paciente registrado en España con coronavirus COVID-19 se conoció el pasado 31 de enero, un paciente alemán ingresado en La Gomera. Su estado era "leve" y se contagió presuntamente, al contactar en Alemania con un infectado. Nueve días después se detectó otro caso en Palma, y el 24 de febrero (presuntamente porque seguramente ya habría más casos no diagnosticados) el virus saltó a la península detectándose los primeros casos en la Comunidad de Madrid, Cataluña y la Comunidad Valenciana. A partir de aquí la historia cambia según quién la cuente, pero en todo caso y lamentablemente las pérdidas humanas han sido demasiadas, insoportables.

La avalancha, tsunami, terremoto... que se nos vino encima ha sido terrible en muchos aspectos: personal, psicológico, económico, político... y todo eso no hizo sino hacernos olvidar mucho de lo que sabíamos sobre bio-contención. En algunos casos, fue sobrevenido como la rotura de stocks de mascarillas, en otros, fue anunciado como la falta de formación y equipación en el ámbito sanitario para hacer frente a algo así, y en la mayoría de los casos, fue el pánico lo que nos hizo actuar de manera alocada (como pollos sin cabeza), bañando en lejía playas y personas, enfundándonos para salir de casa a por el pan en varias capas de bolsas de plástico, tres pares de guantes, mascarillas (una del derecho y otra del revés, por si acaso), botas de pescador, pantallas de leñador y ungüentos alcohólicos varios. Y una vez que volvíamos a casa, había que deshacer el entuerto en el descansillo de la puerta, realizando una tarea de bio-contención y segregación de residuos que ya lo quisieran para sí en alguna de esas películas sobre virus, en las que si al actor le ponen de fondo música de violín y le hacen un primer plano sabes que va a morir. Finalmente, quedaba la ropa que había que lavar a 60°C, a muchos no les gueda ni un solo jersey de lana que le entre en el cuerpo.

En televisión, redes sociales, comunidades de vecinos y círculos afines he leído cientos de protocolos, trucos, productos... que limitaban o reducían el riesgo de contagio por contacto, que descontaminaban... Y dejaré para otra ocasión (pues merece un artículo entero) el uso del ozono por el mecánico de debajo de mi bloque, la de la tienda de ropa, el taxista... como si de un Ambipur se tratara.

Dice una buena amiga mía que quizá habla demasiado como yo, "...a lo que vamos...". El uso de biocidas está reglado desde hace mucho tiempo. Las instrucciones de aplicación y espectro de acción se evalúan por diferentes estamentos públicos que delimitan sus capacidades, y quién lo puede o debe usar en su caso (pues para eso están). Saltarse las normativas, inventarse aplicaciones y no leerse los prospectos han ocasionado problemas de salud o fallos de bio-contención que han derivado en contagios no deseados, cuando no debería haber sucedido así. Cierto es que estábamos en un caso de emergencia mundial, pero teníamos las herramientas, los conocimientos y a los profesionales adecuados para enseñar a usarlos; pero se olvidaron

# **ABS LAB**

de nosotros. Veterinarios, especialistas en bio-contención e incluso el personal de la industria farmacéutica, llevan años utilizando estos productos y tecnologías de manera legal y eficiente, y no se les preguntó o no se les escuchó, porque voces hemos dado en muchos sitios.

Volvamos a lo básico, a recordar que un biocida puede ser una sustancia química, sintética o de origen natural (incluso un microorganismo), que está destinado a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier otro organismo considerado nocivo para el hombre, animales o plantas.

### **;CUÁL ES EL MEJOR BIOCIDA?**

En primer lugar, hemos de valorar la actividad específica que está íntimamente relacionada con la resistencia intrínseca del microorganismo de su propia naturaleza. Desde los priones -mal considerados microorganismos - hasta los menos resistentes como son los virus con envuelta lipídica (el caso del SARS-CoV-2), hay todo un elenco de productos apropiados para cada uno. No parece adecuado utilizar biocidas de "elevada potencia" (peróxido, glutaraldehído...) cuando tratamos de eliminar específicamente uno en concreto que puede ser tratado con otros de menor espectro. La explicación radica en algo muy simple: el equilibrio de los ecosistemas. Al igual que cuando utilizamos antibióticos para tratar enfermedades no susceptibles a los mismos, generando resistencias por mala o inadecuada dosificación; cuando usamos un biocida demasiado potente, estamos rompiendo un equilibrio natural entre microrganismos protectores y microorganismos peligrosos. Se ha utilizado hipoclorito como si no hubiera un mañana, a las dosis a las que cada usuario les parecía adecuado; incluido algún "iluminado", que se le ocurrió rociar una playa con lejía sin darse cuenta de dos cosas: que un sitio abierto era un sitio relativamente seguro, y que existen bajo la arena un montón de bichos que no tenían ninguna culpa. Aún no hemos podido evaluar el daño medioambiental ocasionado por el desequilibrio generado en los ecosistemas fluviales.

En segundo lugar, un buen biocida debe ser compatible con los materiales sobre los que los aplicamos, porque si perdemos ese brillo en el acero o generamos corrosión en superficies, estamos haciendo "un pan como unas tortas". Menudo negocio han hecho no sólo los productores de hipoclorito, sino los fabricantes de pomos de puerta, carros de supermercado, pintores... con la de equipación que se ha deteriorado al bañar todo con un producto que los especialistas sabemos que tiene varias limitaciones de uso, y que siempre es necesario aclarar con agua limpia para evitar la

corrosión, base del anclaje de otros microrganismos y consiguiente formación de biofilms. Y sobre esto me viene a la mente el otro biocida, no químico sino físico, sobre el que también se ha hablado mucho: la luz UV. Su uso indiscriminado también genera problemas de degradación, por no hablar de las limitaciones y requerimientos de uso. No digo que no funcione con SARS-CoV-2, pero hay que saber hasta dónde llega y cómo se utiliza. Pobres de aquellos que confiaron en meter el móvil o las llaves en una caja con luz UV confiando ciegamente en que estaban esterilizándolos. Menos mal que este mal bicho se degrada muy rápido porque si no, los números de contagios no hubieran sido estos. ¿Cuántas fundas de móvil, pantallas, protectores... se han cargado en una acción bastante estúpida?, y perdón por el exabrupto.



Figura 1.- Túnel de desinfección.

La tercera característica que buscamos en el biocida óptimo (si hay alguno) es una baja toxicidad, no sólo ambiental sino también para los humanos. Túneles de desinfección (ver Figura 1), dispersión de ozono en habitaciones y residencias de ancianos, geles alcohólicos con metanol como agente desnaturalizante... alguno de vosotros lectores que sé que me seguís en redes sociales como Linkedin (la única que a mi parecer ha mantenido una línea editorial medianamente científica), ya habréis comprobado cómo me he cebado con los que proponían este tipo de acciones. ¡Señores¡ Un biocida es un veneno que no selecciona mucho contra qué actúa, y todos ellos son tóxicos para los demás seres vivos, en mayor o menor medida. Los que los utilizamos habitualmente sabemos que existen unas siglas: VLA-ED (Valor Límite Ambiental de Exposición Diaria), que indican cuánta dosis podemos recibir los humanos de aquél antes de empezar a tener problemas de salud más o menos serios. Y, ¡qué raro!, todas las VLA-ED están a varios órdenes de magnitud por debajo de las



INVIERNO 2021 / NÚMERO 88

ABS LAB

dosis usadas como biocidas. Al igual que el más que probable desequilibrio medioambiental, veremos en más o menos tiempo envenenamientos derivados del uso indebido o sin el equipo de protección oportuno, para muchos de los utilizados. Harto de ver cómo los equipos de limpieza (en muchos casos no autorizados ni registrados en el ROESB) aplican químicos con protección respiratoria frente a partículas (mascarillas FFP2) o con monos de categoría 4, 5 ó 6; cuando deberían llevar protección química de ambos. Hace tiempo dejé de entrar al juego por hartazgo. ¡Me han fuñigao! (ver Figura 2) decía una pobre señora cuando un tractor pasaba por delante de su casa con los aspersores a todo tren rociando las calles, y la empapaban para proteger de no sé qué supuesto enemigo residente en el suelo o sobre los coches.



Figura 2.- Noticia de la señora anteriormente mencionada.

La cuarta característica que buscamos en un buen biocida es su capacidad de penetración, no en el microorganismos en sí sino a través de todo lo que le rodea. Cuando se evalúa un biocida en laboratorio se hace en condiciones puras y en condiciones de interferencia (normalmente con seroalbúmina o similar) para emular lo que sucede en "campo". Ningún microorganismo está solo (salvo en el tubo de ensayo), en la naturaleza está rodeado de mugre, digámoslo así; y esa mugre contiene otros microorganismos, proteínas, lípidos... que también absorben y gastan el principio activo. Muchos biocidas son incapaces de penetrar en agua o en el biofilm, se disuelven o descomponen antes de ser efectivos y, por eso, el hipoclorito normal es un mal desinfectante si previamente no hemos realizado una limpieza mecánica para disociar esa suciedad. ¿Cuántos de vosotros habéis vertido sangre en un vaso con lejía (al 2%, al 1%... da igual) y ha

precipitado?; pues ese conglomerado protege su interior del biocida, y lo mismo sucede en la calle, en el suelo o en una habitación.

Acabo mi disertación hablando del método de aplicación, muy ligado al anterior punto. Siempre que queramos realizar una descontaminación, hemos primero de acometer una limpieza mecánica previa con jabones o detergentes (que también son buenos biocidas para SARS-CoV-2) para disolver y exponer al microorganismo al desinfectante terminal (ver Figura 3).



Imagen suministrada por la autoría

Figura 3.- Ejemplo de limpieza mecánica previa con jabones o detergentes.

Esa limpieza ha de ser metódica y protocolizada. No estamos limpiando como un camarero la barra de su bar al recibirte y decirte: ¿qué va a tomar?; mientras con una bayeta que quizás debería estar en un zoo (la bayeta digo porque parece que se mueve sola), limpia en círculos que extienden la "mierda"—más que removerla—en vez de realizar un verdadero barrido en una sola dirección. Aun así, si el procedimiento no es evaluado y verificado en cada caso, nunca podremos decir que lo hemos hecho bien, que hemos descontaminado.

Sólo un apunte más, nos hemos empeñado en matar al coronavirus para creernos que estamos a salvo. En salas de contención biológica (NCB3), cuando realizamos la desescalada (el símil que se me ocurre para hablar de la salida bio-segura de la zona bio-contenida) no utilizamos biocidas en nuestro cuerpo, sino una técnica sencilla y efectiva: "arrastre y dilución". Suena raro, pero realmente lo que hacemos es ducharnos de arriba hacia abajo con jabón normal y en una zona específica bio-contenida, de forma protocolizada y arrastrando las posibles partículas hacia el sumidero. Y esto lo hacemos con patógenos mucho más resistentes que coronavirus. Así, bien en los sistemas de gestión

# **ABS LAB**

de efluentes de la sala NCB3 bien en el alcantarillado, se diluirá y desactivará. Por eso, nos han aconsejado lavarnos las manos frecuentemente, para arrastrar hacia el desagüe las posibles partículas infectivas.

### **RESUMEN**

- Realiza siempre una limpieza mecánica previa.
- Elige el biocida adecuado y aplica según protocolo.
- Completa el proceso realizando una descontaminación por pulverización respetando los tiempos de contacto.

Y entonces, sólo entonces, ¡serás un profesional, amigo mío!

### **BIBLIOGRAFÍA**

- https://es.wikipedia.org/wiki/Comisario\_europeo\_de\_Innovación,\_I nvestigación,\_Cultura,\_Educación\_y\_Juventud
- https://www.redaccionmedica.com/secciones/sanidad-hoy/espanaconfirma-su-primer-caso-de-positivo-por-coronavirus-de-wuhan-7264



Más de 400 socios relacionados con el sector de los animalarios

**Anúnciate** en nuestra revista

publicidad.revista@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.



# ENTREVISTA

# Entrevista a Juan Rodríguez Cuesta, Consultor independiente en salud y bienestar animal, y Vicepresidente de la SECAL

Antes de las preguntas, descríbenos tu actividad profesional: tu formación, puesto/cargo actual, qué haces y dónde.

Estudié Veterinaria en la Universidad de Zaragoza y posteriormente un Master en I+D+i de medicamentos en la Universidad de Navarra, donde obtuve el Doctorado en Farmacia. He trabajado durante más de 20 años como veterinario y gestor de animalarios en diversas instituciones públicas y privadas, como: el Centro de Investigación en Farmacobiología Aplicada (CIFA) de la Universidad de Navarra, el Centro de Investigación Cooperativa en Biociencias (CIC bioGUNE), el Centro de Investigación Cooperativa en Biomateriales (CIC biomaGUNE) y en empresas farmacéuticas (Faes Farma S.A., Dominion Pharmakine S.L.).

En la actualidad, trabajo como consultor independiente en salud y bienestar animal en el ámbito de la investigación biomédica, soy vicepresidente de la SECAL, representante de la SECAL en FELASA y consultor ad-hoc de AAALAC International.

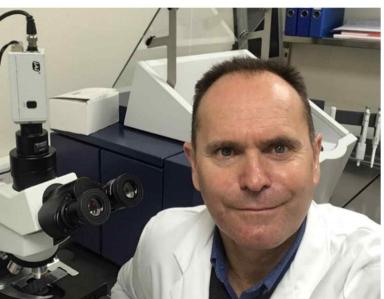


Imagen suministrada por la autori

Descríbenos un día de tu actividad actual en tu centro, tus ocupaciones y responsabilidades.

Trabajo para varias instituciones como responsable principal de la salud y el bienestar de sus animales, mayoritariamente roedores, así como de la formación continuada del personal que trabaja en ellas. El trabajo es similar al que desempeñan otros colegas, pero en varios sitios y con menor carga administrativa. También realizo proyectos puntuales, como el diseño/remodelación de instalaciones para animales de laboratorio y su gestión operativa, la implementación y el mantenimiento de sistemas de calidad en la investigación-preclínica (p. Ej. BPL, AAALAC), entre otros.

¿Cómo entraste en contacto con el animal de laboratorio y cuál ha sido tu trayectoria trabajando con ellos desde entonces?

En 1996 me matriculé en un master de I+D de medicamentos en la Universidad de Navarra (UN) en el que, además de las clases teóricas, había que desarrollar un proyecto en un departamento relacionado con este campo. Como veterinario, me enviaron al Animalario y allí me recibió Javier Guillén, quien me introdujo en este mundo. Tuve mucha suerte, ya no sólo por tener a Javier de jefe, sino por aprender a manejar numerosas especies animales y muchas de las cosas que todavía hoy me resultan muy útiles. En el 2000 me trasladé a Bilbao – donde sigo viviendo en la actualidad– para incorporarme al Departamento de Toxicología de Faes Farma, donde trabajé hasta 2003 como veterinario y director de estudios de toxicología bajo normas BPL. Del 2004 al 2012 fui responsable del Servicio de Animalario del CIC bioGUNE. En 2010 sufrí una pérdida familiar muy dura que junto al estrés del día a día me hizo reflexionar mucho sobre la vida y nuestras prioridades, de tal manera, que en 2013 comencé a trabajar por mi cuenta como asesor en salud y bienestar animal.



INVIERNO 2021 / NÚMERO 88



### ¿Qué cambios has vivido a lo largo de estos años que hayan variado la forma de trabajar con animales?

He observado un cambio relevante en lo relativo a los sistemas de estabulación, principalmente en roedores, tanto en condiciones de biocontención (infección experimental) como de bioexclusión (animales SPF, axénicos, etc.). Los sistemas de imagen *in vivo* (p. Ej. ecografía, PET, SPECT, RMN, sistemas ópticos, etc.) evolucionan a un ritmo frenético. No puedo olvidarme de la revolución que está suponiendo el uso de las herramientas CRISPR de edición genética en animales. Finalmente, la mejora de la formación continuada de las personas que trabajamos con animales, el desarrollo tecnológico y los novedosos materiales de enriquecimiento permiten que el cuidado y el manejo de nuestros animales de laboratorio sea cada vez mejor.

### Cuéntanos un proyecto ideal en el que te encantaría participar

Sería un proyecto a largo plazo que estuviese alineado con el concepto *One Health* (Una Sola Salud), una estrategia mundial para aumentar la comunicación y la colaboración interdisciplinar en el cuidado de la salud de las personas, los animales y el medio ambiente, entendiendo que todas están ligadas entre sí. Y si fuera al aire libre, en contacto con la naturaleza sería ideal, son muchos años "bajo tierra" y necesito sentir más la luz natural. Sería un proyecto en el que el bienestar de los animales fuera lo más importante y en el que la mediocridad y las personas que sólo saben ponerse medallas con el esfuerzo ajeno, brillaran por su ausencia. Bueno, ahora dejo de soñar (es que soy Piscis...) y volvemos a la entrevista.

### Desde tu experiencia profesional, ¿algún consejo para los que empiezan en actividades que implican la utilización de animales de experimentación?

No me siento el más indicado para dar consejo, pero les recomendaría que decidieran qué es lo que más les entusiasma a la hora de trabajar con animales (p. Ej. especie animal, las técnicas de laboratorio, la extracción de muestras biológicas, los estudios de farmacología, los de comportamiento, las técnicas quirúrgicas...). Que se centren en aquello que más les motive, ya que con motivación el rendimiento es mayor. Que hablen siempre con el responsable del animalario para pedirle ayuda, consejo, bibliografía, etc. Que sean socios de la SECAL, donde tendrán acceso a un montón de información útil y al contacto con personas con las que seguir creciendo en su carrera profesional. Finalmente, y tan pronto como la situación debido a la pandemia

por COVID-19 nos deje, que asistan a los congresos y/o a las jornadas científicas de nuestra sociedad. Está claro que la formación on-line es una herramienta muy efectiva para mantener nuestra formación continuada al día y que ha venido para quedarse, pero hecho mucho de menos no poder abrazar a tantos y buenos colegas que tengo repartidos por todo el territorio nacional.

"A los que empiezan les recomendaría que se centren en aquello que les motive, ya que con la motivación el rendimiento es mayor"

### Seguro que tienes muchas anécdotas, ¿compartes alguna, porfavor?

Voy a compartir sólo una para no extenderme... Hacía el año 1998, cuando trabajaba como becario en la Universidad de Navarra, Guillén nos mandó a Elena Ciordia (actual responsable de los animalarios de esta universidad) y a mí a buscar unas tupaias (Tupaia belangeri) al Aeropuerto de Barajas. Salimos a las seis de la mañana en un todo terreno viejo que nos dejó el Departamento de Zoología (o de Botánica, no lo recuerdo bien). Hacía mucho frío, la carretera estuvo helada desde Pamplona hasta el destino. Ya en el aeropuerto, el caos era total, era víspera de Navidad y los pocos funcionarios que había creo que le habían dado al cava... Despachamos las cajas con los animales bien entrada la tarde. Durante el viaje de vuelta, Elena y yo no oíamos ningún ruido procedente de las cajas y en ningún momento vimos moverse a los animales. ¡¡¡Nos temíamos lo peor!!! Cuando llegamos Elena dijo que se iba a casa y que hiciéramos la recepción de los animales Javier y yo. Durante más de tres largas horas estuvimos sacando uno a uno a los 60 animalitos y colocándolos en sus jaulas. ¡¡¡Sí, estaban todos vivos y coleando!!! Las tupaias son algo parecidas a las ardillas, pero más pequeñas, muy ágiles y rápidas. Fue una odisea: se nos metían entre las piernas, se subían por los hombros y la cabeza. Si hubiésemos grabado un video de ese día, no tendría precio. Fue una jornada agotadora, pero inolvidable que acabó tomando alguna que otra copa en la barra de algún bar de Pamplona.

### Hablemos de nuestra SECAL, ¿cómo la conociste y desde cuándo formas parte como socio?

Fue a través de J. Guillén en 1996 y desde 1998 soy socio. Mi primer congreso fue el de SECAL/FELASA/ICLAS en Palma de Mallorca en 1999. Desde entonces sólo he faltado al de Córdoba en 2007.

# **ENTREVISTA**

### ¿Qué supone para ti formar parte de la junta como vicepresidente?

Un reto profesional, ya que es la antesala a la presidencia. Un periodo de formación para conocer nuestra sociedad por dentro y afrontar de la mejor forma posible los diferentes asuntos durante mi etapa como presidente. Mi paso por la Vocalía de Formación (2014-2017) me está ayudando mucho en este proceso de aprendizaje, aun así, son muchos los asuntos con los que hay que lidiar, uno no se puede relajar en exceso. También es cierto que, la actual Presidenta, Isabel Blanco, no nos deja relajar: siempre aporta ideas e iniciativas que discutir y poner en marcha.

### ¿Cómo se vive desde dentro nuestra Sociedad?

Con ilusión y con mucha intensidad. Es mucha la actividad que se genera a diario. El trabajo de las distintas Vocalías requiere bastante dedicación. Formación y Comunicación tienen una agenda muy ocupada: nanocursos, becas de formación, la nueva web, las jornadas de formación on-line (y la Asamblea General) que hemos organizado en 2020 motivado en gran medida por la pandemia. Toda esta actividad pasa por Secretaría y Tesorería, al final, está todo el mundo liado. Lo bueno es que la Junta cuenta con personas muy activas, inquietas y trabajadoras y, así, se pueden hacer cosas.

### ¿Cómo valoras la evolución de la SECAL a lo largo del tiempo: compromisos adquiridos, funciones, congresos, etc.?

Mi sensación es que evoluciona favorablemente y con paso firme. Somos la asociación de referencia en España –y en muchos países de Sudamérica– en nuestro ámbito. Esta mejora continua es posible gracias al legado que han dejado las juntas anteriores, desde 1989. Sirvan estas líneas para mandar mi agradecimiento a los socios fundadores, ya que gracias a su determinación y buen hacer podemos hablar hoy de una Sociedad que sigue más viva que nunca.

Está siendo un año muy complicado sanitariamente y estamos viviendo una época en la que muchas personas han girado su mirada hacia la ciencia, tan necesaria y tantas veces "recortada". ¿Cuál es tu valoración/opinión sobre ello? ¿Cómo ves el futuro de la ciencia en este aspecto?

Está siendo un año para olvidar, pero también debemos reconocer nuestra suerte al trabajar en un sector que ha sido considerado como esencial. En general y – en particular en este paísparece que siempre tienen que pasar cosas graves para que se busquen soluciones a problemas que venimos arrastrando históricamente. Tenemos investigadores e investigadoras de calado

internacional que, en la mayoría de los casos, tienen que investigar fuera pues en España no es viable. Si se quedan, lo tienen que hacer en muchas ocasiones de manera precaria. Confío en que la crisis económica y sanitaria causada por la pandemia actual haga reflexionar a los políticos y se acuerden mejoras de financiación del sistema, que lo hagan de una forma duradera y con visión a largo plazo para estar mejor preparados ante nuevas pandemias.

# Si pudieses enviar un mensaje a los mandatarios y a la sociedad en general a cerca de la importancia de la ciencia, ¿cuál sería? (¡expláyate!)

Como secaler@s que somos les mandaría un mensaje para recalcar la relevancia del animal de laboratorio en la investigación científica. Me ha gustado mucho una campaña televisiva reciente en la que se dice: "...si invirtiendo sólo un 1,24% de nuestro PIB en ciencia, hemos conseguido por primera vez eliminar un tipo de cáncer en modelos animales. ¿Te imaginas lo que conseguiríamos si invirtiésemos el 2%?...". Este tipo de mensajes causan un gran impacto en la opinión pública, pero también tienen que llegar a los partidos políticos y que estos se pongan de acuerdo para actuar.

Quizás peque un poco de corporativista, pero les pediría también un mayor protagonismo de la profesión veterinaria en general en el sistema sanitario y en particular en esta crisis sanitaria. No en vano, un porcentaje muy elevado de las enfermedades emergentes a nivel mundial (p. Ej. fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, Ébola, la fiebre Lassa, la fiebre del Valle del Rift, los virus Zika y Nipah, o la actual COVID-19) son de origen animal y acaban cada año con millones de vidas en todo el mundo. Como dice el lema de nuestra profesión higia pecoris, salus populi (la higiene del ganado, la salud del pueblo). La labor que realizan los veterinarios en la prevención de enfermedades en los animales no sólo protege su salud y bienestar, sino que es uno de los pasos más efectivos para salvaguardar la salud de las personas.

"La labor que realizan los veterinarios en la prevención de las enfermedades en los animales es uno de los pasos más efectivos para salvaguardar la salud de las personas"

### En el día a día en tu trabajo, ¿cuál es el momento más gratificante?

Iba a decir que cuando salgo por la puerta, pero no: cuando un investigador o investigadora te pide consejo en la fase del diseño experimental o ayuda para evaluar el estado de salud de los

# **ENTREVISTA**

### **ANIMALES DE LABORATORIO**

INVIERNO 2021 / NÚMERO 88

animales que está utilizando. Me encanta trabajar con usuarios en los que se percibe gran sensibilidad a la hora de manipularlos. También al supervisar una cirugía, comprobar que todos los aspectos importantes impartidos están correctamente implementados. Trabajar con gente comprometida con el bienestar animal me tranquiliza mucho y permite relajarme en esa labor policial que muchos de los que nos dedicamos a esto tenemos que ejercer todos los días.

"Trabajar con gente comprometida con el bienestar animal me tranquiliza mucho"

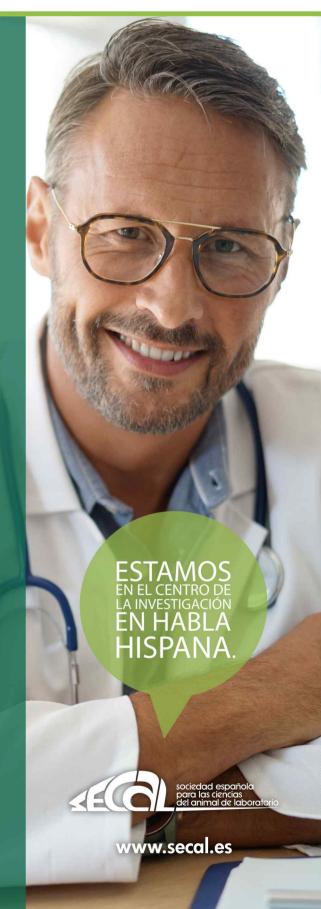
¿Cómo concilias tu faceta profesional, tu compromiso con la SECAL, tu familia, etc.?

Tengo que tirar de agenda, la de papel de toda la vida, hay que ser una persona muy organizada para mantener un cierto equilibrio entre la actividad profesional y la personal. Con el tiempo he aprendido a decir que no a ciertas propuestas: estar por estar no va conmigo. Si no voy a ser capaz de dedicarle el tiempo para hacerlo bien prefiero no comprometerme.

Ya conocemos más sobre lo que haces y piensas, pero por favor, defínete en una frase. ¡Muchas gracias!

"...No es la especie más fuerte la que sobrevive, ni la más inteligente, sino la que responde mejor al cambio..." (Charles Darwin)

# HAZTE SOCIO BENEFACTOR TU EMPRESA TAMBIÉN PUEDE SER PARTE DE LA SECAL





# El coronavirus causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) es el único coronavirus zoonótico que produce brotes frecuentes a partir del huésped reservorio cercano: el dromedario

¿Sabías que las infecciones experimentales de camélidos con MERS-CoV requieren instalaciones de biocontención especializadas, y qué solo tres de ellas en el mundo han infectado con éxito camélidos con MERS-CoV? El Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA) en España es uno de ellos.

Una comprensión integral de la infección en dromedarios es fundamental para diseñar las recomendaciones de salud pública e implementar estrategias de intervención para mitigar los eventos de propagación. Los modelos experimentales de la enfermedad por reservorio son imprescindibles para comprender la patogénesis y la transmisión, y son clave para elaborar posibles vacunas contra MERS-CoV en humanos y dromedarios.



# CENCIA CENCIA WWW.seral



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.

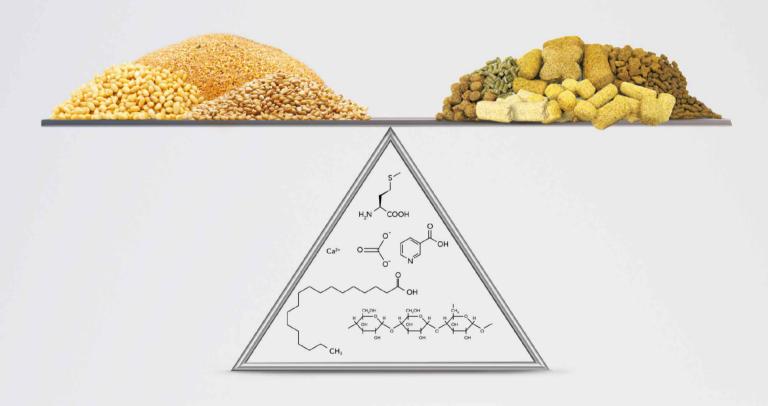
For more information, please contact us at services@eu.crl.com





# 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

+