

ANIMALES DE LABORATORIO

VERANO 2021 / NÚMERO 90



**30 años del NO-DO de la SECAL:
el comienzo visible del trabajo en equipo**

**Impacto de la microbiota intestinal
en los modelos experimentales murinos**

**Ratones inmunodeprimidos:
el puente entre el laboratorio y los pacientes**

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





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

www.secal.es

DIRECTORA

Lara Sedó Cabezón
direccion.revista@secal.es

SUBDIRECTORA

María Granada Picazo Martínez
direccion.revista@secal.es

EDITORES DE ESTILO E IMAGEN

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

PUBLICIDAD

David Mayo López
publicidad.revista@secal.es

FOTO DE PORTADA

Suministrada por la autoría
DISEÑO Y MAQUETACIÓN
www.cervantes.agency
pluscs@hotmail.com

IMPRIME

LPG
lpgetextil@gmail.com

DEPÓSITO LEGAL

M-1362-1999

Continuidad

Damos la bienvenida al número de verano con la celebración del 30 aniversario de la publicación del primer boletín informativo de la SECAL, los inicios de nuestra actual revista. En 1991, apenas unos años después de que se instaurara la SECAL, varios intrépidos compañeros (algunos todavía al pie del cañón) vieron la necesidad de establecer una comunicación entre todos los miembros que componían la sociedad. Una pequeña vía para intercambiar desde protocolos hasta ofertas de trabajo, así como otras sugerencias destinadas a mejorar la calidad del trabajo diario. Unos años después, el NO-DO se reconvirtió en la actual revista, y más adelante llegaron otras vías más rápidas y actuales de comunicación, como la lista de correo de la SECAL-L, pero esto ya es otra historia.

30 años después, la revista continua más viva que nunca. Para acompañaros a lo largo de estos calurosos días, hemos preparado un número de lo más variado y entretenido. En él, hablamos desde la microbiota intestinal en modelos murinos hasta la generación de ratones inmunodeprimidos. Nos acercamos un poquito más al mecanismo de acción del SARS-CoV-2. Intentamos mejorar nuestras condiciones laborales conociendo las causas de la fatiga por compasión, y profundizamos en las técnicas de manejo no aversivo, en este caso, en la rata. Si hace unos números nos adentrábamos en el cuidado del mosquito como animal de laboratorio, aquí vamos a descubrir cómo funcionan las instalaciones para poder estudiar la malaria con el objetivo clave de su futura erradicación. También conocemos un protocolo de extracción de vesículas extracelulares a partir de la leche animal, y vemos cómo mejorar la reproducibilidad científica y reducir el número de animales desde los Órganos Habilitados. Terminamos este número, sorprendiéndonos conociendo a la cierva roja como un modelo más al lado de los humanos.

Esperamos que disfrutéis de este número.

¡Os deseamos un feliz verano!

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.
- ▶ PERKINELMER
- ▶ PROLABOR
- ▶ RETTENMAIER IBERICA, S.L. Y CIA SCOM
- ▶ SEGURIDAD Y BIENESTAR ANIMAL, S.L.
- ▶ SODISPAN RESEARCH, S.L.
- ▶ STERILTECH, S.L.
- ▶ STERIS IBERIA, S.A.
- ▶ TEMINOX C.B.
- ▶ TROVAN
- ▶ VESTILAB C.R.C., S.L.U.
- ▶ VIVOTECNIA RESEARCH
- ▶ ZOONLAB GmbH



SOCIOS
BENEFACTORES



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
jmarbars@gobiernodecanarias.org



Panorama
**JAVIER
GUILLÉN IZCO**
jguillen@AAALAC.org



Control sanitario
**JOSEF M'
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:

Carme Cucarella, Servicio de transgénesis y biotecnología del IBV-CSIC;
Personal de la Unitat d'Experimentació Animal de Medicina de la Universitat de Barcelona, con la imagen de la portada.

Cursos reconocidos por la autoridad competente para obtener las Funciones A, B, C, D y E y válidos en toda España. Matrícula reducida para las personas procedentes de SECAL

Una formación de calidad para una investigación de
calidad

Su bienestar es nuestro
bienestar



sociedad española para las ciencias del animal de laboratorio

Con la colaboración de SECAL



Animalaria
Formación y Gestión S.L.

www.animalaria.org Tel. +34 699921930
animalaria@animalaria.org

3 EDITORIAL

9 NOTICIAS

- 30 años del NO-DO de la SECAL: el comienzo visible del trabajo en equipo.
- Vídeo "La experimentación animal da vida".
- Póster del acuerdo COSCE por la Transparencia en Experimentación Animal.
- La SECAL participará con un stand en ExpoBioterios Virtual 2021.
- Disponibles los vídeos del webinar de la SECAL sobre el Resumen No Técnico y la Guía sobre el mantenimiento de la capacitación del personal.
- La SECAL apoya la iniciativa *One Health*.
- Comunicado: la SECAL muestra su rechazo por el maltrato animal en las imágenes divulgadas en las instalaciones de la empresa Vivotecnia.

19 ACTUALIDAD

- Transforman por primera vez astrocitos en neuronas específicas para reparar circuitos visuales.
- Desarrollan un fármaco que revierte los síntomas del Alzheimer en ratones.
- Investigadores españoles desarrollan un fármaco antitumoral cuyos ensayos clínicos se realizarán a escala mundial.

25 TÉCNICAS

- Tratamiento de leche animal para la extracción de vesículas extracelulares en investigación biomédica.

29 SEGURIDAD EN 5 MINUTOS

- Causas de la fatiga por compasión o *Burnout*.

31 AL CUIDADO

- Técnicas de manejo no aversivo en la rata.

37 ¿Y TÚ QUÉ OPINAS?

- Desde el ratón, y otros amigos, al humano: entendiendo a SARS-CoV-2.

41 PANORAMA

- El mosquito como animal de laboratorio II.

47 CONTROL SANITARIO

- Impacto de la microbiota intestinal en los modelos experimentales murinos.

51 REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA

- Ratones inmunodeprimidos: el puente entre el laboratorio y los pacientes.

63 CEEA-OH

- Cómo mejorar la reproducibilidad científica y reducir el número de animales desde los Órganos Habilitados.

65 UN MODELO AL LADO DE LOS HUMANOS

- Muestras de leche, heces o hisopos vaginales de esta cierva roja (*Cervus elaphus*) han brindado, a un grupo de investigadores españoles y holandeses, información importante para comprender la epidemiología de *Coxiella burnetii* en la interfaz vida silvestre-ganado-humanos.



17 a 19 - noviembre - 2021

XVI Congreso
de la Sociedad Española para las
Ciencias del Animal de Laboratorio



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 de 2021

Fecha límite para inscripción a talleres: 22 de octubre de 2021

Web: <http://congresosecal.org/>

Twitter: <https://twitter.com/SECAL2021>



30 años del NO-DO de la SECAL: el comienzo visible del trabajo en equipo

Carmina Fernández Criado

Miembro nº2 de la SECAL

Palabras clave: aniversario, SECAL, publicación.

Hace ya más de treinta años, un grupo de profesionales relacionados con la ciencia del animal de laboratorio, con una gran ilusión, nos propusimos constituir una Sociedad Científica que agrupara el sector. Para eso, marcamos unos objetivos reflejados en el artículo 2 de los estatutos. A día de hoy, podemos decir con satisfacción que esas metas se han cumplido con creces.

En 1986 sucedió un hecho que marcó un antes y un después en el sector, se publicó la Directiva 609/86 que obligaba a articular en los países miembros una legislación. Se presentó un borrador del futuro Real Decreto y acudieron a la convocatoria más de cien profesionales del sector procedentes de todas las Comunidades Autónomas; la preocupación por la incidencia que podía tener la redacción de ese texto en nuestros puestos de trabajo era grande. A raíz de esto, los foros de debate adquirieron una relevancia decisiva en lo que en un futuro fue nuestra sociedad. En marzo de 1988, se publicó el primer RD 223/88.

Comenzamos a trabajar, se buscó un nombre para la sociedad "Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL)", un compañero se encargó de conseguir un "logo", y se redactaron los estatutos provisionales. El 17 de noviembre de 1989, se firmó el Acta de Constitución de la SECAL, se aprobaron los estatutos provisionales y se nombró una Junta Directiva provisional. Organizamos el I Simposio de la SECAL, en febrero de 1991, por cierto, fue un éxito, nos conocimos personalmente muchos de nosotros y nos hicimos visibles en los foros internacionales relacionados con el animal de laboratorio (ver Figuras 1, 2 y 3).



Imagen suministrada por la autoría

Figura 1.- Asistentes al primer simposio de la SECAL celebrado en febrero de 1991.



Imagen suministrada por la autoría

Figura 2.- De izquierda a derecha: Gloria Lete, Rosa Morales y Pilar Bringas, algunas de las primeras tesoreras de la SECAL.



Imagen suministrada por la autora

Figura 3.- De izquierda a derecha: Alberto Giráldez, Jose María Orellana, Carmina Fernandez Criado y Jordi Cantó, algunos de los primeros presidentes de la SECAL.

Una de las preocupaciones desde la constitución de la SECAL era la comunicación con los Miembros, por eso, acordamos enviar un boletín informativo.

Así surge, en 1991, **el NO-DO de la SECAL**, cuyo artífice fue Cathy Mark, quien dominaba por aquel entonces el programa *Word-Perfect 5.0*, una novedad para muchos de nosotros. Este noticiero comenzó con buen humor y mucha imaginación, desde su nombre, para los que sois más jóvenes deciros que se inspiró en el noticiero que durante muchos años se ponía en los cines antes de la proyección de las películas. Las secciones de los diferentes NO-DOs se organizaban sin un orden establecido, según las informaciones que los miembros de la SECAL iban aportando: bolsas de trabajo, colaboraciones con otras sociedades, métodos alternativos, información sobre la objeción de conciencia, cómo registrar un animalario, etc. Jordi Cantó se encargaba de proporcionar los índices de revistas relacionadas con nuestra profesión, suponía una información bibliográfica importante para

todos los que no podíamos acceder a éstas, ¡qué gran trabajo Jordi! Participaban en su edición muchos compañeros que, actualmente, siguen colaborando activamente, aunque algunos ya no están con nosotros, un recuerdo para Alberto Giráldez.

Mirando algunos ejemplares que guardo de 1991, se puede apreciar lo rápido que evolucionaban las cosas, los primeros números los imprimíamos en la *"multicopista"* de mi centro de trabajo, sistema manual muy artesano, con la ayuda inestimable del personal auxiliar. Los ejemplares de 1994 ya tienen mejor presentación, comenzaron las fotocopiadoras.

Nuestra editora, Cathy Mark, siempre nos animaba en la sección "¡Esto no tiene nombre!" a sugerir nuevos nombres para este noticiero. Así que en el año 1995, nace el BOLETÍN INFORMATIVO DE LA SECAL con un maquetado más actual, la informática avanzaba inexorablemente y se notó el cambio. El responsable de este cambio fue Manolo Moreno, con la colaboración de Jordi Cantó, Alberto Giráldez, Patri Vergara, Gloria Lete, Jesús M. Zúñiga, Pepe Orellana y yo misma.

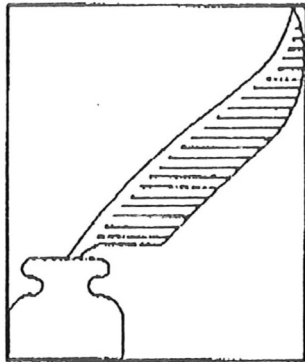
Se siguió publicando este Boletín hasta 1997. Las diferentes Juntas de Gobierno se plantearon editar una revista en la que se pudieran publicar trabajos aportados por los Miembros; así, después de mucho trabajo, en septiembre de 1998, se publicó el Nº1 de la REVISTA DE LA SECAL, dirigida por Manuel Moreno, revista que ha ido evolucionado y adquiriendo una extraordinaria calidad científica.

Todos estos avances se han conseguido gracias a los socios de la SECAL, nunca han faltado colaboradores. Aunque los tiempos han cambiado, hay muchos socios jóvenes que siguen manteniendo ese espíritu de compañerismo y buen ambiente que ha caracterizado nuestra sociedad y que nos ha permitido crecer y mejorar el cuidado de los animales.

No quiero terminar sin felicitar a las directoras, editores de estilo e imagen y responsable de sección de la revista actual, habéis conseguido dotar a la SECAL de una revista que cumple con uno de los requisitos más importantes, ser útil.

ASAMBLEA GENERAL 1991

El siguiente es un resumen del acta de la asamblea general de la SECAL, celebrada el día 22 febrero 1991.



1. Se aprobó la admisión de nuevos miembros; hasta la fecha la SECAL se compone de 232 socios.

2. MEMORIA DE ACTIVIDADES

- * Recogida de información bibliográfica, legislación, etc. y envío a los miembros.
- * Presentación de la SECAL por parte del Presidente a Ministerios y Comunidades Autónomas.
- * La SECAL es "miembro científico" de ICLAS.
- * FELASA: La SECAL ha solicitado, en febrero de 1990, la integración en dicha federación. Según los estatutos de la misma, no es posible que dos sociedades de un mismo país pertenezcan a FELASA. Después de las conversaciones mantenidas con el Presidente y el Secretario de FELASA en el transcurso del simposio de la SECAL, nuestro presidente, por recomendación de FELASA, mantendrá conversaciones con la Soc. Española de Experimentación Animal con el fin de nombrar un representante de las dos sociedades en FELASA. Esta actuación nunca nos haría perder nuestra identidad.
- * Se han mantenido contactos con el M^o de Agricultura con el fin de agilizar el proceso de homologación de personal de animalarios y la organización de cursos de formación, ya que las gestiones realizadas en el M^o de Educación no han dado ningún resultado.

3. Se acordó incrementar la cuota anual para 1991 en 500 pesetas, por lo que los recibos con las cuotas de 1991 serán por un importe de 3500 ptas.

4. Los estatutos reformados de la SECAL serán enviados en breve a todos los miembros.

5. La nueva Junta de Gobierno, resultante de las últimas elecciones, ha quedado compuesta por los siguientes miembros:

EDUARDO GOÑALONS SINTES	(Barcelona) Tf. 581-2020
JORDI CANTO i MARTORELL	(Barcelona) 581-2157
ALEJANDRO MENDEZ GONZALEZ	(Madrid) 346-6341
JAVIER MADROÑAL PEDRAZA	(Madrid) 262-9190
JESUS MARTIN ZUÑIGA	(Granada) 29 52 08
IONACIO TINTORE BLANC	(Barcelona) 330-9513
PATRI VERGARA ESTERAS	(Barcelona) 581-1848
CARMEN FERNANDEZ CRIADO	(Madrid) 397-5476
ANGEL BERJON SAN JUAN	(Pamplona) 25 21 50
JOSE MIGUEL MORAN PENCO	(Badajoz) 23 88 00
ISABEL GONZALEZ FERNANDEZ	(Madrid) 543-9783
M ^o JOSE D. MERU-URRUTIA	(País Vasco) 490-3100
GLORIA LETE VERGARA	(Vizcaya) 484-7700
XAVIER CASANOVA DANES	(Barcelona) 581-1848

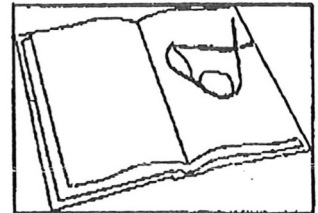
6. Próximo simposio de la SECAL

- Se presentaron dos propuestas:
- * La Sociedad Francesa de Experimentación Animal (SFEA), a través de su Presidente, nos invita a realizar el próximo año un congreso conjunto de las dos sociedades en Francia. Se acordó estudiar la propuesta.
- * El miembro de la SECAL Dr. Tur Marí, de la Universidad de las Islas Baleares, ofrece organizar el próximo simposio en esta universidad.

7. Cursos destinados a personal auxiliar de animalarios, organizados por la SECAL: se acuerda estudiar un programa genérico y contemplar la posibilidad de organizarlo en cada Autonomía por miembros de la SECAL.

8. El miembro de la SECAL José Luis Gómez Rivero ofrece su asesoramiento como abogado a la SECAL. Es aceptado inmediatamente por la Mesa.

REUNION CON LA CEE



Durante el simposio de la SECAL, se desarrolló una reunión informal con Mr. Tim Smyrniotis (representante de la CEE), JM Morán Penco (SECAL, Badajoz), J Palacín (SECAL, Madrid), FJ Armengol (SECAL, Barcelona), F Mirat (Com Autónoma de Madrid), J Madroñal (SECAL, Madrid), J Cantó (SECAL, Barcelona), A Guaitani (GISAL, Italia) y F Norido (Italia). Aquí resumimos algunos puntos de esta reunión.

Respecto a titulaciones, los colegios profesionales (Consejo de Colegios) deben fijar las horas lectivas, así como acreditar las horas necesarias y homologarlas, en los estudios sobre animales de laboratorio. El Colegio de Veterinarios lo hace, y la Comunidad de Madrid lo ha tenido en cuenta, por ejemplo, para los méritos de los inspectores de Sanidad Animal.

Se debe de establecer contacto con las facultades y con el M^o de Educación, para que pongan especialidades medias, acorde con las necesidades de los cuidadores, técnicos de animales de laboratorio, etc.

Por último, hay que empezar por presionar al M^o de Educación para que colabore en estos temas.

A Morán Penco le preocupaba el control de calidad de la investigación, como análisis y normas uniformes y homologados dentro de la CEE para el uso de animales, control de plenos, etc.

Smyrniotis comentó que la CEE recibe del M^o de Agricultura la información en los temas que nos pueden interesar. Por ello, cualquier acción o petición debe pasar por este ministerio.

En Holanda, el M^a de Salud mantiene una lista de los alumnos de los cursos de capacitación, consultado por las empresas que desean contratar a alguien para el manejo de animales. Un graduado estudia un año para especializarse en temas diversos que incluyen ética y métodos alternativos al uso de animales. Investigadores, técnicos y cuidadores tienen cursillos de capacitación de tres semanas.

La CEE, aunque no tiene competencia para legislar en el tema, está elaborando un guía de recomendaciones para las cuatro categorías de usuarios de animales de laboratorio. En concreto, la FELASA puede ayudar mucho en la organización.

Según Armengol, en Francia, la autoridad competente autoriza cursos que imparten instituciones diversas, y el M^a de Agricultura podría autorizar a la SECAL dar cursos.

En definitiva, la SECAL debe hacer todo lo que pueda y buscar convalidaciones, etc. en los ministerios, para que asuman sus cursos.

XIX COLOQUIO de la SFEA 1991



Con el título "Evolución en Experimentación Animal", la Sociedad Francesa de Experimentación Animal anuncia su 21^o Coloquio, que tendrá lugar el 5, 6 y 7 de Junio 1991 en Châtenay-Malabry.

La sesión "Evolución de modelos animales" incluye ponencias sobre animales transgénicos, ratones SCID; modelos para estudios de gerontología y miopatías, entre otras. "La evolución de la investigación y protección animal" tratará de ética, el uso de la estadística, modelación molecular y cultivos celulares, mientras en "El animal de laboratorio: modelo único" se hablará de experimentación animal en la genética, los límites de modelos "in vitro" en biología, desarrollo y control de vacunas, contradicciones inmunológicas en respuestas "in vivo" e "in vitro", cirugía experimental, e investigación de comportamiento. Finalmente, "La evolución de aspectos legislativos y reglamentarios" tratará de la legislación francesa y europea, inspecciones veterinarias, el punto de vista de la CEE, y el impacto de la legislación sobre la aplicación de GLP.

El programa incluye, además, una exposición comercial durante el curso del coloquio.

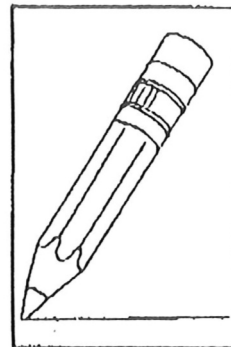
Para más información sobre este coloquio:

Martine Chopin
INSERM U 93
Hôpital St-Louis
1, Ave Claude Vellefaux
75475 Paris Cedex 10
Tel. 42.02.28.35
Fax 42.06.84.54

Los precios de inscripción citados en la carta que recibimos son de 700 FF (miembros de la SFEA) y 1100 FF (no miembros).

BOLSA DE TRABAJO

La SECAL cuenta con una bolsa de trabajo. En vista de la situación actual, quizá no debe de sorprender que tenemos muchas demandas de trabajo, pero pocas ofertas. Si buscas personal o tienes previsto ampliar la plantilla de tu animalario, por favor, avisa a la Secretaría de la SECAL. Te enviará los currículum de todas aquellas personas calificadas para el puesto que tenemos a nuestra disposición.



MIRANDO AL MAR, SOÑE...

Tenemos una petición de un grupo que necesita datos sobre instalaciones para el uso de peces en la investigación. Si alguien posee información sobre acuarios de agua salada, llama a la Secretaría de la SECAL. Te pondrá en contacto con aquellos que han solicitado esta información.

¡ESTO NO TIENE NOMBRE!

Evidentemente, este noticiero no puede llamarse así. Por ello, estamos abiertos a todas vuestras sugerencias de un nombre adecuado para el boletín informativo de la SECAL. No es necesario ser socio, y probablemente habrá algún pequeño detalle a modo de premio. Afila lápiz (¿y sentido de humor?) y manda las sugerencias al Secretariado.

Han contribuido a este número C. Fernández Criado, P. Jorge, J. Madroñal y C. Mark.

Solicitamos vuestra colaboración, noticias, datos, preguntas, anuncios de cursos y cursillos, críticas, etc. Ponte en contacto con:

Carmen Fernández Criado
Secretaría de la SECAL
Gabinete Veterinario, UAM
Arzobispo Morcillo, 4
28029 Madrid
Tf: (91) 397-5476
Fax: (91) 585-4015



sociedad española
para las ciencias
del animal de laboratorio

Vídeo "La experimentación animal da vida"

Palabras clave: transparencia, SECAL, bienestar.

La Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL) ha realizado este vídeo <https://secal.es/video-la-experimentacion-animal-da-vida/> (ver Figura 1), patrocinado por Laboratory Animals Limited (LAL), en el que científicos, como el Dr. Luis Enjuanes (CSIC) y el Dr. Mariano

Barbacid (CNIO), y profesionales de las ciencias del animal de laboratorio como: Isabel Blanco, Mayte Lamparero, Carlos Carnero, Elena Hevia y Juan Rodríguez, responden a preguntas sobre la utilidad de los animales en las diferentes investigaciones biomédicas.

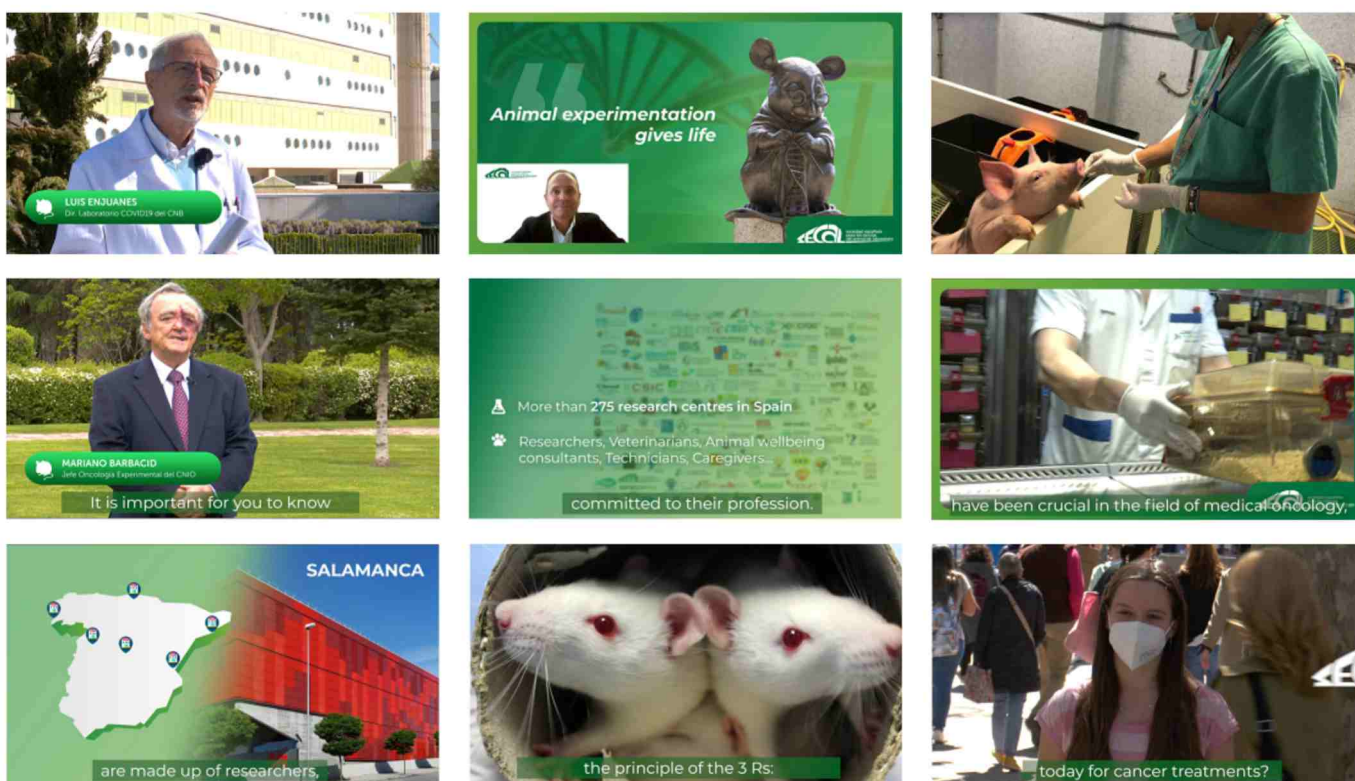


Figura 1.- Diversas imágenes del vídeo "La experimentación animal da vida".

The
Easy
IVC™

NEXGEN



¡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.

≡ Allentown ≡

Póster del acuerdo COSCE por la Transparencia en Experimentación Animal

Palabras clave: COSCE, SECAL, transparencia.

La Confederación de Sociedades Científicas de España ha difundido este póster (ver Figura 1) sobre los cuatro puntos en los que se basa el Acuerdo de Transparencia sobre el uso de animales en experimentación científica en España, en el que la SECAL está adherida y participó en su redacción. El póster ha sido diseñado

por BINAEX y cedido a la COSCE para su uso y difusión.

Os animamos a colgarlo en vuestros animalarios e instituciones <https://secal.es/poster-del-acuerdo-cosce-por-la-transparencia-en-experimentacion-animal/>



Figura 1.- Póster del acuerdo de transparencia sobre el uso de animales de experimentación científica en España.

La SECAL participará con un stand en ExpoBioterios Virtual 2021

Palabras clave: SECAL, ExpoBioterios, congreso.

Tras el éxito de la primera edición, en 2020, el congreso ExpoBioterios (ver Figura 1) repetirá este año su formato virtual. La SECAL ya ha confirmado que participará con un stand en la zona de expositores; concretamente, el número 5 del Pabellón Amazonia.

Podéis consultar el programa e inscribiros en su web <https://www.expobioteriosvirtual.com/>



Figura 1.- Congreso ExpoBioterios Virtual 2021.

Disponibles los vídeos del webinar de la SECAL sobre el Resumen No Técnico y la Guía sobre el mantenimiento de la capacitación del personal

Palabras clave: transparencia, MAPA, legislación.

En el área de *webinars* de la web de la SECAL <https://secal.es/webinars-secal/>, ya están disponibles los vídeos de estos dos eventos.

Por una parte, la presentación de Pilar León, Jefe de servicio de Bienestar Animal del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, sobre la actualización de los **Resúmenes No Técnicos** (RNT). Los RNT permiten proporcionar información a los ciudadanos interesados en el modo y las razones por las que se utilizan animales con fines científicos o de docencia. Además, en ellos se explican las características de los proyectos, sus fines, los animales que se tiene previsto utilizar y qué estrategias se utilizarán para garantizar la aplicación de las 3Rs (Reemplazo de los animales en la medida de lo posible, Reducción de su número, y Refinamiento de las técnicas aplicadas y condiciones de mantenimiento para evitar tanto como sea posible el dolor, estrés o angustia prolongada a los animales involucrados), siempre que

estas actuaciones no menoscaben la calidad de los resultados científicos que se esperan obtener https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/bienestanimal/en-la-investigacion/Resumenes_no_tecnicos_de_los_proyectos.aspx.

Y, por otra, la presentación de la **Guía sobre el mantenimiento de la capacitación del personal** con la participación de: Rosa Nieto, Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Nutrición Animal, Estación Experimental del Zaidín, CSIC; Elena Rosique, Técnico de Gestión del Servicio de Producción Animal de la Región de Murcia; Patri Vergara, Catedrática de la Universitat Autònoma de Barcelona, organizadora de cursos de formación para todas las funciones; y Isabel Blanco, Presidenta de la Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio.

La SECAL apoya la iniciativa *One Health*

Palabras clave: SECAL, salud, *One Health*.

La SECAL ha manifestado su apoyo a la iniciativa *One Health* promovida por el Consejo General de Enfermería, el Consejo General de Colegios Farmacéuticos, el Consejo General de Colegios de Médicos, el Consejo General de Colegios Veterinarios, la Conferencia Nacional de Decanos de Enfermería, la Conferencia Nacional de Decanos de Farmacia, la Conferencia Nacional de Decanos de Medicina y la Conferencia Nacional de Decanos de Veterinaria de España.

En este documento podéis encontrar más información sobre esta iniciativa, incluyendo las líneas estratégicas a seguir para alcanzar este objetivo: **Posicionamiento conjunto sobre la necesidad de implementar el enfoque *One Health*** <https://secal.es/wp-content/uploads/2021/02/Posicionamiento-conjunto.pdf>.

En este posicionamiento, se hace un llamamiento a que otras instituciones, sociedades científicas y fundaciones manifiesten su adhesión, y, así, avanzar hacia la implementación del enfoque global *One Health* como modelo fundamental para mejorar la salud pública, al considerar que tanto la salud humana, la salud animal y la protección del medio ambiente, se hallan estrechamente relacionadas entre sí y conforman un espacio común.

Además, el citado documento insiste en que la actual pandemia ha surgido en un mundo en transformación, en el que el cambio climático, la globalización, el incremento de la demanda de alimentos, la pérdida de biodiversidad y la deforestación favorecen un mayor contacto entre vida silvestre, animales de producción y humanos.

Comunicado: la SECAL muestra su rechazo por el maltrato animal en las imágenes divulgadas en las instalaciones de la empresa Vivotecnia

Palabras clave: SECAL, manifiesto, maltrato animal.

El objetivo general de la SECAL es racionalizar y mejorar el uso del animal de laboratorio al servicio de la salud del ser humano y de los animales, fomentando la relación y cooperación entre los profesionales de nuestro sector. Desde su creación, la SECAL ha trabajado para hacer compatible el avance de la ciencia con el cuidado adecuado de los animales, respetando su dignidad y maximizando su bienestar.

Por todo lo anterior, la SECAL no puede más que manifestar el más absoluto rechazo y condena a las imágenes divulgadas, pues dañan la razón de ser de nuestra Sociedad, y llevan al traste muchos años de duro trabajo destinados a mejorar de manera continuada el cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Estas imágenes no representan el buen hacer mayoritario que se lleva a cabo en nuestro sector y tampoco el de una Sociedad, cuyo origen es compatibilizar el trato digno y respetuoso de unos animales que nos ayudan a avanzar en el progreso científico, y a los que tanto se les debe.

Confiamos en que las autoridades competentes investiguen estos hechos y se depuren las responsabilidades que correspondan con la mayor prontitud y ejemplaridad. Por nuestra parte, seguiremos trabajando como hemos hecho hasta la fecha e intentando mejorar, más aún, para evitar que hechos de esta naturaleza se repitan en el futuro.

Asegurando su Investigación



ENRICHMENT

BEDDING

SERVICES

DIETS

CUSTOM
DIETS

Su Colaborador para el
Cuidado del Animal de Laboratorio
Experimente la diferencia: soluciones
completas para su trabajo de investigación.
Beneficiarse de la competencia del fabricante
en las ciencias del animal de laboratorio.

Quality. Reliability. SAFETY.



Diets
Custom Diets
Bedding
Enrichment
Services



DIETS

CUSTOM DIETS

BEDDING

ENRICHMENT

Transforman por primera vez astrocitos en neuronas específicas para reparar circuitos visuales

Palabras clave: neurociencias, reprogramación, ceguera.

Una investigación llevada a cabo en el Instituto de Neurociencias UMH-CSIC de Alicante liderada por la Dra. Guillermina López-Bendito (ver Figura 1) demuestra, por primera vez, que es posible obtener neuronas específicas de una región cerebral determinada a partir de astrocitos, un tipo de célula del sistema nervioso con funciones muy importantes para el funcionamiento del cerebro.

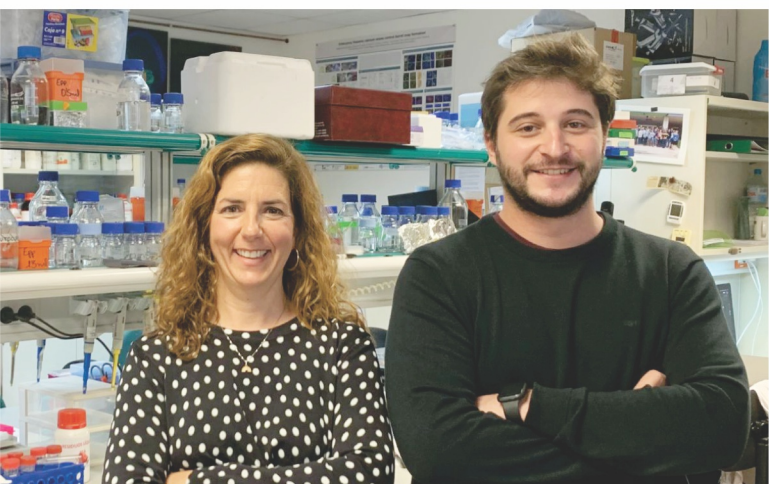


Imagen suministrada por la autoría

Figura 1.- Los investigadores Guillermina López-Bendito y Álvaro Herrero-Navarro del Instituto de Neurociencias UMH-CSIC de Alicante.

Estos astrocitos han sido reprogramados mediante un factor proneural, utilizando un virus modificado para hacerlo llegar a su destino en el cerebro de ratones. Además, con esta investigación han descubierto que los astrocitos en regiones cerebrales concretas expresan genes propios de sus **neuronas “hermanas”** (procedentes de una célula progenitora común), haciendo posible su reprogramación en un tipo de neurona sensorial específica.

“Hemos descubierto que genes clásicos de las neuronas también son expresados por los astrocitos, aunque en un nivel menor. Hay un código propio de cada región cerebral que comparten los astrocitos y las neuronas, y probablemente también otras células nerviosas. Esto es importante porque abre la posibilidad a recuperar, en el futuro,

circuitos neuronales perdidos en ciegos o sordos congénitos”, explica la Dra. López-Bendito, que es directora de la Unidad de Neurobiología del Desarrollo del Instituto.

Este proyecto, denominado “Reprogramación de células talámicas para el restablecimiento de circuitos sensoriales”, ha sido financiado por la Generalitat Valenciana con 400.000 euros y es la semilla para un nuevo proyecto impulsado por la Fundación La Caixa con 499.000 euros, a través de la Convocatoria CaixaResearch de Investigación en Salud.

Gracias al tálamo, una estructura cerebral que actúa como un simulador del mundo exterior antes del nacimiento, el cerebro ya empieza su “puesta a punto” de sentidos como el tacto y la vista; como demostró el laboratorio de la doctora López-Bendito en trabajos anteriores.

Las dos estructuras cerebrales implicadas en este proceso son: el tálamo, que recibe la información del exterior; y la corteza cerebral, que la procesa. Cuando hay una pérdida en la captación de los **estímulos sensoriales**, parte de las neuronas y los circuitos de estas dos regiones del cerebro se pierden o se reducen considerablemente.

Los astrocitos, un tipo de células nerviosas con forma de estrella, podrían ser cruciales para restaurar esos circuitos perdidos. Hasta hace poco, se consideraba a estas células gliales “actrices secundarias” en el cerebro y la médula espinal. Consideradas, tradicionalmente, como proveedoras de alimento y soporte estructural a las neuronas, el papel de los astrocitos va más allá y participan, también, en tareas que antes se consideraban exclusivas de las neuronas, como el procesamiento, la transferencia y el almacenamiento de información.

En esta línea, el descubrimiento del laboratorio de la Dra. López-Bendito añade otra prueba del importante papel de los astrocitos; los cuáles son capaces de transformarse en neuronas al ser inducidos, con el potencial regenerativo que esto supone. Otro hallazgo de este trabajo es que las células que se generan en una zona concreta del cerebro –ya sean neuronas u otros tipos de células nerviosas– comparten una **firma molecular**. Es,

precisamente, la expresión génica específica de cada región compartida con las neuronas la que confiere a los astrocitos la capacidad de convertirse en neuronas de un tipo concreto en determinadas condiciones.

La hipótesis de partida del grupo de la Dra. Guillermina López-Bendito fue que, dado que las neuronas y los astrocitos se generan a partir de las mismas zonas germinales, podrían compartir firmas moleculares comunes que reflejen su origen y actúen potencialmente para coordinar las características de desarrollo específicas de la región a la que pertenecen.

Así, han descubierto que los astrocitos del tálamo y de la corteza cerebral presentan firmas transcripcionales y epigenéticas específicas de la región a la que pertenecen. Esas firmas las comparten con las neuronas generadas dentro de la misma región, pero no con las de otras regiones, proporcionando un grado notable de especificación regional para la reprogramación de astrocitos en neuronas inducida por un factor proneural, o gen maestro, denominado **Neurogenina-2**. Para introducir este gen maestro, el laboratorio de la Dra. López-Bendito ha inyectado en el tálamo postnatal de los ratones un virus que infecta sólo a los astrocitos y logra reprogramarlos para que se conviertan en neuronas, abriendo la puerta a recuperar los circuitos sensoriales de la vista o el oído, dañados en etapas tempranas de la vida.

En otras palabras, como los astrocitos y las neuronas comparten progenitor y la expresión de genes específicos de una región, es esa firma molecular la que dirige la reprogramación inducida por factores de transcripción, para que los astrocitos adquieran una identidad similar a la de sus neuronas hermanas.

Además, han visto que al manipular ese código genético específico de cada región se redirige la reprogramación de los astrocitos hacia neuronas de identidad regional diferente, pero predecible, en función de la manipulación efectuada.

*“Ahora estamos intentando averiguar si de **forma espontánea**, los astrocitos pueden convertirse en neuronas en situaciones concretas; por ejemplo, cuando provocamos un aumento de astrocitos reactivos”,* explica la Dra. López-Bendito. Los astrocitos reactivos se encargan de proteger a las neuronas cuando se produce un daño, aunque en ocasiones su actuación también puede perjudicarlas si su reacción es muy potente.

El aumento del número de astrocitos reactivos o astrogliosis favorece que estas células se vuelvan más maleables o más

“dóciles”: *“en esas circunstancias, pensamos que tal vez sin necesidad de introducir un gen maestro que guíe la reprogramación, podríamos observar de forma espontánea esa capacidad de los astrocitos para convertirse en neuronas”,* señala la Dra. López-Bendito.

“Con este trabajo se demuestra que el proceso de reprogramación de astrocitos a neuronas es factible. Y lo hemos conseguido en estudios tanto in vitro como in vivo en ratones control. Ahora nuestro reto inmediato –y proyecto presente– es hacerlo posible en modelos de ratón con ceguera congénita. En estos animales utilizaremos esta misma técnica para reprogramar astrocitos sensoriales y que se conviertan en neuronas visuales que suplan a las que se habían perdido”, concluye la Dra. López-Bendito.

El científico Álvaro Herrero, primer firmante de la investigación, ha precisado que en el estudio han comprobado que podían producir esa reprogramación incluso en ausencia de un daño específico, y ha explicado que ahora están trabajando para llevar la misma técnica a modelos animales tanto de ceguera congénita como de ceguera derivada de un glaucoma.

Herrero ha informado que en siguientes fases se van a centrar en mejorar la eficiencia de esa reprogramación celular en modelos animales con pérdida sensorial, y en comprobar que se produce una regeneración completa y funcional de los circuitos neuronales dañados: *“una vez que la estrategia sea lo más óptima posible, podremos empezar a pensar en trabajar con organismos superiores y en el diseño de la forma más adecuada y menos invasiva de producir esta regeneración”,* ha señalado el investigador del Instituto de Neurociencias.

- Herrero-Navarro A., Puche-Aroca L., Moreno-Juan V., et al. *Astrocytes and neurons share region-specific transcriptional signatures that confer regional identity to neuronal reprogramming.* *Sci. Adv.* 2021;7(15):eabe8978.

- Nota de prensa - Comunicación Instituto de Neurociencias.

- <https://www.rtve.es/noticias/20210409/investigadores-espanoles-logran-transformar-celulas-neuronas-capaces-reparar-danos-visuales/2085216.shtml>

Desarrollan un fármaco que revierte los síntomas del Alzheimer en ratones

Palabras clave: Alzheimer, autofagia, envejecimiento.

Investigadores de la Facultad de Medicina Albert Einstein de Nueva York han diseñado un fármaco experimental que potencia un tipo de autofagia, un mecanismo natural de limpieza celular que elimina las proteínas no deseadas, y que es capaz de revertir los síntomas de la enfermedad de Alzheimer en ratones, el paso previo para que funcione en humanos.

El estudio, publicado en la revista *Cell*, ha sido dirigido por una de las científicas españolas más destacadas: Ana María Cuervo, doctora titular de la Cátedra Robert y Renée Belfer para el Estudio de las Enfermedades Neurodegenerativas y co-directora del Instituto de Investigación sobre el Envejecimiento en el *Albert Einstein College of Medicine* de Nueva York.

“Los descubrimientos en ratones no siempre se trasladan a los humanos, especialmente en la enfermedad de Alzheimer, y no queremos crear falsas expectativas” advierte la Dra. Cuervo, pero, con esta investigación, *“pensamos que podría funcionar porque lo único que estamos haciendo es reponer una función de la célula al nivel juvenil”*, explica la doctora, para ello, *“básicamente usamos la forma natural en que las células eliminan la toxicidad en una persona joven”*, insiste.

El compuesto reactiva la autofagia mediada por chaperonas (AMC), un **proceso de limpieza celular** clave para la salud y el envejecimiento, descubierto por esta bióloga celular en los 90.

A medida que envejecemos, la autofagia pierde eficiencia y permite que las proteínas tóxicas se acumulen provocando daños a las células. Es como meter la basura en bolsas y que no se las lleve el basurero; cuando esto ocurre, el cerebro desarrolla enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, cuyos pacientes tienen agregados proteicos tóxicos en el cerebro, “como bolsas de basura en una huelga de limpieza”.

En este trabajo, la Dra. Cuervo demuestra que la pérdida de AMC en las neuronas contribuye al desarrollo de Alzheimer en animales, ya que en estos modelos la AMC está disminuida, lo que significa que los fármacos para reactivar esta forma de autofagia podrían tratar las enfermedades neurodegenerativas.

Primero, la Dra. Cuervo y su equipo analizaron si la alteración de la AMC contribuye al Alzheimer, y para ello usaron un **ratón modificado genéticamente** en el que las neuronas cerebrales excitadoras carecían de este proceso de limpieza celular.

Esta falta de AMC provocó pérdida de memoria a corto plazo, dificultades de movimiento y otros problemas relacionados con los síntomas de la enfermedad de Alzheimer; pero, sobre todo, alteró profundamente la proteostasis, es decir, la capacidad de las células para regular y degradar las proteínas que contienen.

La Dra. Cuervo sospechaba que lo contrario también era cierto y que el Alzheimer temprano afectaba a la AMC, así que estudió un modelo de ratón de Alzheimer temprano en el que las neuronas producían copias defectuosas de la proteína Tau (clave en el desarrollo de la enfermedad).

Luego, usando pacientes, observaron que el nivel de actividad de la AMC en el tejido cerebral estaba algo inhibido en las primeras fases del Alzheimer, y mucho más inhibido en los casos de los pacientes con Alzheimer avanzado.

Cuando las personas llegan a los 70 u 80 años, la actividad de la AMC suele estar en torno a un 30% disminuida, una reducción de actividad que el cerebro de la mayoría de las personas puede compensar, pero si coincide con una enfermedad neurodegenerativa se convierte en una mezcla con efectos devastadores.

Estas investigaciones han sido la base del fármaco desarrollado por la Dra. Cuervo, un compuesto que mejora la AMC elevando los niveles de un componente clave: el **receptor LAMP2A**, que recibe a las proteínas dañadas unidas a las chaperonas para destruirlas en los lisosomas (los “puntos limpios” en los que se elimina la basura celular).

Este compuesto –denominado CA– restaura el LAMP2A a niveles juveniles y ayuda a la AMC a deshacerse de la Tau y otras proteínas defectuosas para que no forme cúmulos tóxicos.

El medicamento, suministrado a dos modelos diferentes de ratón de la enfermedad de Alzheimer durante 4-6 meses, mejoró la memoria, la ansiedad y la capacidad motora sin dañar otros órganos.

“El fármaco no ataca la causa del Alzheimer sino la consecuencia, que es la acumulación de proteínas tóxicas dentro de la célula, que causa los síntomas. Por eso, si funciona esperamos poder mantener a los pacientes asintomáticos, como cuando tenían 20 años”, detalla la doctora.

Para ello harán falta estudios con otros animales más parecidos a los humanos (para asegurarse de que no tiene efectos tóxicos), mientras la Dra. Cuervo y su equipo siguen buscando mecanismos alternativos para estimular la limpieza celular y ver si se pueden usar en otras enfermedades.

- <https://www.lavanguardia.com/vida/20210422/7016063/desarrollan-farmaco-revierte-sintomas-alzheimer-ratones.html>
- https://www.abc.es/salud/enfermedades/abci-este-farmaco-experimental-limpia-basura-celular-causa-alzheimer-202104221710_noticia.html
- <https://www.infosalus.com/farmacologia/noticia-farmaco-experimental-muestra-potencial-contrainfermedad-alzheimer-20210426080435.html>

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

ESTAMOS
EN EL CENTRO DE
LA INVESTIGACIÓN
EN HABLA
HISPANA.

Investigadores españoles desarrollan un fármaco antitumoral cuyos ensayos clínicos se realizarán a escala mundial

Palabras clave: antitumoral, pez cebra, ratón.

La Universidad Católica de Murcia (UCAM), el Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB) y la Universidad de Granada han presentado nuevos resultados de su estudio para la búsqueda de fármacos que actúen ante la migración e invasión de las células tumorales, y que ha dado lugar a una patente. Tras el éxito de las investigaciones *in vitro* e *in vivo*, próximamente, se comenzará con los ensayos clínicos en pacientes oncológicos.

Mediante técnicas de química computacional en supercomputadores, los investigadores han rastreado diferentes fármacos y han encontrado un nuevo uso para el fármaco antidepresivo **imipramina** como inhibidor de la fascina-1; una proteína, cuya sobreexpresión se asocia con cánceres de mama y colorrectales con muy mal pronóstico, y que en la mayor parte de los casos no disponen de una terapia antitumoral específica. Empleando modelos animales de pez y roedor, los investigadores han comprobado que bloqueando la fascina-1 con imipramina estas células tumorales se vuelven menos invasoras y menos metastásicas (ver Figura 1).

Tras el descubrimiento de este nuevo uso de la imipramina, se comenzaron a desarrollar pruebas *in vitro*, y el éxito observado en modelos de pez cebra llevó a los investigadores a proteger sus hallazgos con una patente. Los estudios posteriores realizados en modelos de invasión en ratón han confirmado la actividad antitumoral de este fármaco (ver Figura 1).

Próximamente, se comenzará a trabajar en **ensayos clínicos** en pacientes oncológicos de la Región de Murcia, gracias a los fondos obtenidos a través de una convocatoria del Instituto de Salud Carlos III. Además, a través de la OTRI (Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación) de la Universidad Católica de Murcia, se ha tramitado la licencia de la patente a la empresa americana *Ennaid Therapeutics*, lo que permitirá continuar con los ensayos clínicos y su explotación comercial no sólo en Europa como hasta ahora, sino también en EE. UU., Canadá, Australia y Japón.

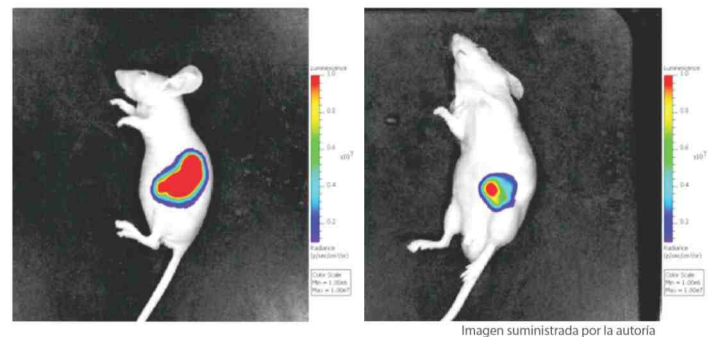


Figura 1.-El grupo de ratones tratados con imipramina (derecha) desarrollan tumores más pequeños que el grupo control (izquierda). Fuente UCAM.

El desarrollo de esta patente ha sido posible gracias a Pablo Conesa del Hospital Universitario Santa Lucía de Cartagena y jefe de grupo del IMIB, y a Horacio Pérez, miembro del Grupo de Investigación BIO-HPC de la UCAM, junto a los investigadores de la Universidad de Granada: Irene Luque, Javier Ruiz y José Cristóbal Martínez. Del IMIB, también han participado Manuel Bernabé, María Luisa Cayuela, Ángel Bernabé, Juan Cabezas y Francisco José Nicolás; y de la UCAM, Silvia Montoro y Begoña Albuquerque.

- <https://www.ucam.edu/noticias/desarrollan-en-la-region-la-patente-de-un-farmaco-antitumoral-cuyos-ensayos-clinicos-se>
- <https://www.infosalus.com/farmacia/noticia-investigadores-espanoles-desarrollan-farmaco-antitumoral-cuyos-ensayos-clinicos-realizaran-escala-mundial-20210326104952.html>

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

iwt
a **TECNIPLAST** company

representado por

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

WWW.IWTSRL.IT | WWW.MATACHANA.COM

Tratamiento de leche animal para la extracción de vesículas extracelulares en investigación biomédica

María Isabel González Gutiérrez^{1,2}

¹Unidad de Medicina y Cirugía experimental, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón

²Unidad de Imagen Avanzada, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) Carlos III

Palabras clave: centrifugación, exosomas, leche.

INTRODUCCIÓN

La leche animal es uno de los principales elementos de la dieta del ser humano, especialmente, la de vaca, cabra y oveja. En el conocimiento popular está establecida la idea de que la leche es uno de los pilares fundamentales para el desarrollo del sistema inmune, fortaleciendo las barreras defensivas del organismo y extendiendo, así, su consumo desde la edad infantil hasta la adulta.

En los últimos años, los científicos han puesto el foco de investigación en la gran cantidad de vesículas extracelulares contenidas en la leche como promotores de la maduración del sistema inmune infantil. Estas vesículas tienen su origen en diferentes poblaciones celulares presentes en las glándulas mamarias como las células madre, las células epiteliales o las células del sistema inmune. Una vez secretadas, las vesículas extracelulares quedan contenidas en la leche y se incorporan al sistema circulatorio del organismo consumidor tras ser absorbidas en el intestino (ver Figura 1). Su contenido, que incluye microARN y proteínas bioactivas, es capaz de interferir en procesos fisiológicos tales como la activación y maduración de las células del sistema inmune, el desarrollo del intestino e incluso en procesos antiinflamatorios¹.

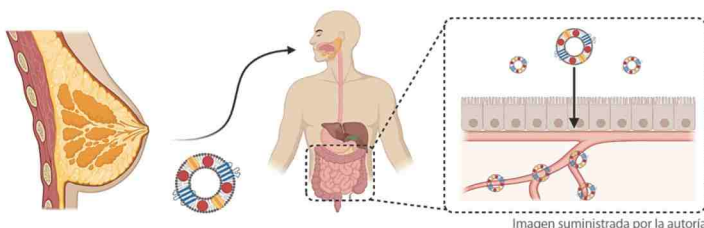


Figura 1.- Las vesículas extracelulares contenidas en las glándulas mamarias se incorporan al organismo a través del consumo de leche. Estas vesículas son capaces de llegar al sistema circulatorio una vez han sido absorbidas en el intestino. Figura creada con BioRender.com (bajo licencia).

Son muchos los subtipos de vesículas extracelulares presentes en la leche, diferenciándose en función de sus características morfológicas y su biogénesis. De entre ellas, los exosomas destacan no sólo por participar en los roles biológicos anteriormente descritos, sino por su pequeño tamaño (30-150 nm) y su estructura de bicapa lipídica². Estas características, unidas a su origen natural, los postulan como posibles sustitutos de las nanopartículas sintéticas diseñadas con fines biomédicos, como los liposomas.

El primer paso para poder estudiar el comportamiento y potencial uso en biomedicina de las vesículas extracelulares contenidas en la leche es aislarlas de este fluido biológico. Para ello, la técnica más empleada es la centrifugación diferencial unida a ultracentrifugación¹. Esta metodología permite el tratamiento de grandes volúmenes de muestra a temperaturas controladas, resultando especialmente útil en el caso de fluidos biológicos como la leche. Este artículo recoge algunas de las consideraciones que se deben tener en cuenta para la correcta extracción de vesículas extracelulares de la leche, así como, recomendaciones basadas en la propia experiencia del grupo de investigación.

MATERIALES

Leche

Obtener la leche directamente del origen animal que se desea estudiar asegura que ningún tratamiento adicional haya podido alterar la integridad de las vesículas extracelulares. Se recomienda mantener la leche refrigerada (4°C) hasta llevar a cabo el protocolo de extracción de las vesículas. Si el tiempo desde la obtención de la muestra de leche hasta la extracción es prolongado, se puede alícuotar y mantener a -80°C para evitar la degradación de las vesículas.

En caso de adquirir la leche directamente en una tienda o un supermercado, se recomienda comprar leche fresca. En la bibliografía se ha detallado que el proceso de pasteurización al que se ha sometido la leche no parece afectar a la integridad de las vesículas celulares contenidas en ella³. Por el contrario, otros trabajos sugieren que, en las leches tratadas a altas temperaturas, ultrapasteurización (UHT), se puede alterar significativamente el contenido de las vesículas celulares presentes en este fluido biológico¹.

Instrumental

- Centrífuga de altas prestaciones o ultracentrífuga: se requiere que la centrífuga empleada sea capaz de alcanzar una velocidad de 100.000 g (fuerza centrífuga relativa) o 30.000 rpm, aproximadamente, y 4°C de temperatura. Normalmente, este tipo de centrífugas van equipadas con un rotor de ángulo fijo (ver Figura 2).



Imagen suministrada por la autoría

Figura 2.- Rotor de ángulo fijo para centrifugas de altas prestaciones. Beckman Coulter Inc. (California, USA).

- Tubos de extracción: deben adaptarse a las características del rotor de la centrífuga. Los tubos de policarbonato, equipados con tapa, pueden reutilizarse en múltiples ocasiones y son fáciles de lavar (ver Figura 3).



Imagen suministrada por la autoría

Figura 3.- Tubos de policarbonato equipados con tapa de la marca Beckman Coulter Inc. (California, USA).

- Micropipetas y tampón fosfato salino (PBS 1X).

DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE EXTRACCIÓN

La metodología de centrifugación diferencial y ultracentrifugación para la extracción de vesículas extracelulares se basa en someter a este fluido biológico a diferentes rondas de centrifugación; empezando por velocidades bajas, que permitan eliminar diferentes elementos característicos de la leche, e incrementándolas hasta lograr precipitar las vesículas (ver Figura 4).

La gran mayoría de publicaciones realizan todos los pasos incluidos de centrifugación a una temperatura de 4°C. El esquema general, basado en diferentes publicaciones de la literatura^{4,5}, sería el siguiente:

- Centrifugación a velocidades comprendidas entre 3.000 y 5.000 g: permite la precipitación de la grasa de la leche y los glóbulos de grasa contenidos en ella. Los tiempos de centrifugación varían en la bibliografía. Según la propia experiencia del grupo de investigación, tiempos cortos de 10-15 minutos son suficientes para lograr la precipitación de

estos elementos. A estas velocidades también es posible precipitar los agregados de caseína, una de las proteínas de la leche que más suelen contaminar las muestras de vesículas extracelulares. Una vez acabada la centrifugación, se transfiere el sobrenadante resultante a nuevos tubos, descartando en los usados los elementos precipitados.

- Centrifugación a velocidades comprendidas entre 12.000 y 13.000 g: permite aumentar la eliminación de caseína, así como precipitar restos celulares (en inglés, *cell debris*). Según la experiencia del grupo, tiempos de 30-35 minutos son suficientes para precipitar estos elementos. Una vez acabada la centrifugación, se transfiere el sobrenadante resultante a nuevos tubos, descartando en los usados los elementos precipitados.
- Centrifugación a velocidades próximas a 35.000 g: permite precipitar vesículas extracelulares grandes. Para ello, una ronda de centrifugación de 15 minutos resulta suficiente. Una vez acabada la centrifugación, si se considera que las vesículas celulares de interés se pueden encontrar contenidas en el precipitado (p. ej. microvesículas de tamaño comprendido entre 100-1.000 nm), se descartaría el sobrenadante, acabando con el protocolo de extracción. Las vesículas aisladas se pueden resuspender en PBS empleando una micropipeta, evitando tocar el producto precipitado con la punta de la misma. La muestra resultante se puede conservar a 4°C por tiempos cortos o congelada por periodos más largos. Si se desea precipitar poblaciones de vesículas extracelulares de menor tamaño (p. ej. exosomas de 30-150 nm), se transfiere el sobrenadante resultante a nuevos tubos, descartando en los usados los elementos precipitados.
- Centrifugación a velocidades comprendidas entre 100.000 y 135.000 g: permite centrifugar vesículas extracelulares pequeñas. La velocidad mínima para conseguir precipitar esta población de vesículas es 100.000 g, siendo recomendable extender la ronda de centrifugación por un tiempo mínimo de 1 a 2 horas. Una vez acabada la centrifugación, las vesículas extracelulares pequeñas quedan precipitadas en el tubo de extracción, por lo que el sobrenadante puede descartarse. Las vesículas aisladas se pueden resuspender en PBS empleando una micropipeta, evitando tocar el producto precipitado con la punta de la misma. La muestra resultante se puede conservar a 4°C por tiempos cortos o congelada por periodos más largos.

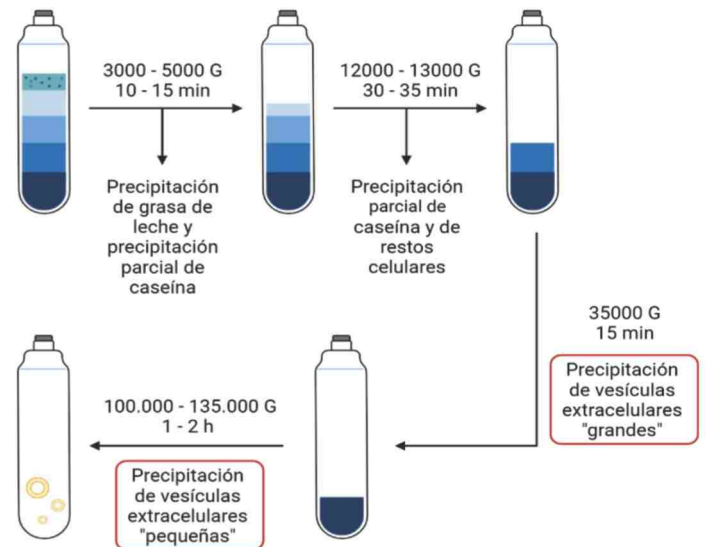


Imagen suministrada por la autoría

Figura 4.- Esquema del protocolo de extracción de vesículas extracelulares de leche mediante centrifugación diferencial y ultracentrifugación. Figura creada con BioRender.com (bajo licencia).

CONSIDERACIONES GENERALES

1. La eficacia del proceso de extracción depende de muchos factores: tipo de leche según la especie, tratamiento previo de la leche en caso de ser comercial, así como, condiciones técnicas de los instrumentos de centrifugación. En este artículo se recogen los pasos de extracción más repetidos en diferentes artículos científicos, incluyendo la propia experiencia del grupo de investigación en la extracción de exosomas de leche de cabra. Por lo tanto, cada investigador debe valorar si podría optimizar este protocolo en función del material de estudio e instrumental del que disponga.
2. Es importante considerar que los tubos de extracción colocados en posiciones opuestas deben tener pesos/volúmenes similares, mejorando el rendimiento de extracción y asegurando la seguridad del equipo, especialmente, en las centrifugaciones de velocidades más altas.
3. Según se incrementa la velocidad de centrifugación requerida en el protocolo, la centrífuga puede tardar un tiempo en alcanzarla. Se recomienda consultar el manual de uso de la misma para determinar el tiempo exacto, aunque para velocidades altas se recomienda añadir 5 minutos al tiempo base de centrifugación.

4. Los precipitados de vesículas extracelulares, especialmente, en el caso de las más pequeñas, pueden resultar difíciles de localizar, debido a su aspecto gelatinoso y transparente. Se recomienda realizar una marca en el tubo con un rotulador antes del paso de centrifugación correspondiente, teniendo en cuenta que la zona de precipitación de las vesículas variará en función de la posición del tubo en el rotor de la centrifuga.
5. Una vez precipitada y resuspendida en PBS la población de vesículas extracelulares deseada, es recomendable realizar algún lavado. Para ello, se puede volver a centrifugar la suspensión de vesículas durante 1,5-2 horas, con el fin de eliminar principalmente los restos de proteínas de leche que pudiesen haber co-precipitado junto con las vesículas durante el proceso de extracción. Otra opción es utilizar filtros de membrana con el tamaño de poro adecuado en función de las vesículas.

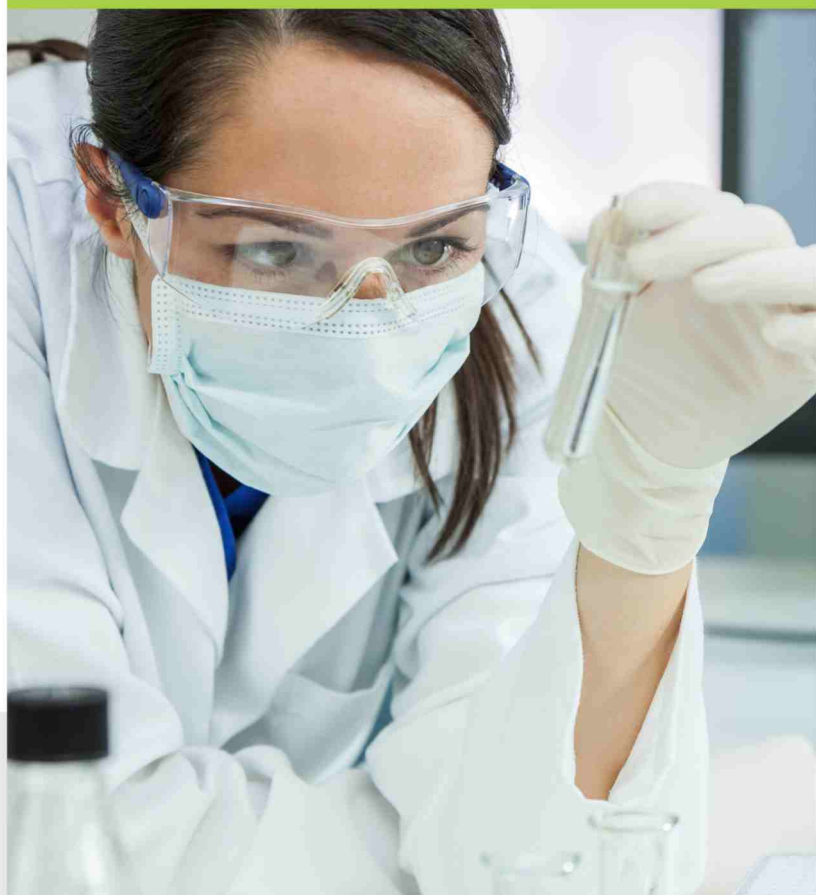
CONCLUSIONES

Actualmente, el estudio de las vesículas extracelulares contenidas en la leche resulta de gran interés tanto para ampliar el conocimiento del rol biológico de la leche en el sistema inmune como para evaluar su potencial uso como sustitutos naturales de nanopartículas sintéticas. Es difícil estandarizar un único protocolo de extracción de vesículas extracelulares de la leche, ya que las condiciones de partida de este fluido biológico y del instrumental disponible en el laboratorio influyen en el rendimiento de la extracción. Sin embargo, la metodología de extracción más empleada es la centrifugación diferencial unida a ultracentrifugación, ya que permite trabajar con grandes volúmenes de muestra y aislar las vesículas extracelulares en condiciones bien controladas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sanwlani R., Fonseca P., Chitti S., et al. *Milk-derived extracellular vesicles in inter-organism, cross-species communication and drug delivery*. *Proteomes*. 2020;8(2):11.
2. Bilal M. and Goettsch C. *Extracellular vesicles as delivery vehicles of specific cellular cargo*. *Cells*. 2020;9(7):1601.
3. Bartijn B., Arntz O., Bennink M., et al. *Commercial cow milk contains physically stable extracellular vesicles expressing immunoregulatory TGF- β* . *PLoS one*. 2015;10(3):e0121123.
4. González M.I., Gonzalez-Arjona M., Santos-Coquillat A., et al. *Covalently Labeled Fluorescent Exosomes for In Vitro and In Vivo Applications*. *Biomedicines*. 2021;9(1):81.
5. Munagala R., Aqil F., Jeyabalan J., et al. *Bovine milk-derived exosomes for drug delivery*. *Cancer letters*. 2016;371(1):48-61.

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



Estamos en el centro de
**la investigación en habla
hispana**



sociedad española
para las ciencias
del animal de laboratorio

www.secal.es

Causas de la fatiga por compasión o *Burnout*

Jesús Martínez Palacio

Técnico Superior en Prevención de Riesgos Laborales
Responsable del Servicio de Zootecnia del CIEMAT

Palabras clave: fatiga por compasión, agotamiento emocional, *Burnout*.

En la aparición del *Burnout* (fatiga por compasión o agotamiento emocional, en nuestro caso), varios autores han estudiado qué factores determinan la aparición del mismo, aunque estos han sido llevados a cabo en trabajos no relacionados con la experimentación animal.

En general, el trabajo tiene dos vertientes:

LAS EXIGENCIAS

Los estresores relacionados con el trabajo.

La carga de trabajo y la presión temporal explican entre el 25% y el 50% de la aparición del *Burnout*, especialmente en el caso del **agotamiento emocional**. En el estudio realizado por Lee y Ashforth (1996), se asigna a nivel general, un 42% de importancia.

Sin duda, en nuestro ámbito profesional, estos factores también juegan un papel importante, aunque no suelen reflejarse en los estudios que hemos realizado durante años sobre Riesgos Psicosociales en el CIEMAT (alumnos del curso de Prevención de Riesgos Laborales en Experimentación Animal).

En el trabajo realizado por Pfenning y Hüsich (1994), el **conflicto de rol** (de vigilantes de prisiones) o la **ambigüedad de rol** (de enfermeras), explican respectivamente: el 24% y 14% del agotamiento emocional, el 13% y 8% de despersonalización, y el 2% y 10% de baja realización emocional. Son niveles a tener en cuenta por su repercusión en el nivel de *Burnout*.

Estos factores, que se reflejaban marcadamente en el estudio realizado hace años sobre una amplia muestra de trabajadores del ámbito de la experimentación animal en España, son sin duda determinantes de la aparición de la fatiga por compasión en nuestro gremio. La dicotomía entre cuidar al animal y generar conocimiento útil para las personas frente al dolor o daño infligido al mismo es, en mi opinión, uno de los principales factores a tener en cuenta.

LOS RECURSOS

El apoyo social y los factores que regulan o autorregulan las actividades o tareas.

Aunque la relación no sea tan importante como en las exigencias del trabajo, **la falta de apoyo social** por parte de los supervisores, especialmente, está especialmente relacionada con niveles elevados de *Burnout* (del mismo modo que una falta de *feedback* en el trabajo se relaciona en sentido positivo con las tres dimensiones del síndrome).

Pero la falta de apoyo social no sólo se refiere a los supervisores, también se sufre de un modo general o de la opinión pública. Estos días hemos vivido todos la estigmatización de la profesión a causa del "*affaire* Vivotecnia", y nos hemos visto escrutados y obligados a justificarnos. Este factor también destacaba en el estudio general que realizamos desde el CIEMAT hace años.

De un modo más moderado, una falta de participación en la toma de decisiones y de autonomía está inversamente relacionada con un elevado *Burnout*.

En el caso de la experimentación animal, los factores asociados a "recursos" se pueden considerar más determinantes que en otros grupos laborales. Se han descrito diferentes iniciativas en este sentido:

- **Seminarios científicos adaptados al personal de animalario:** permite comprender la importancia del trabajo con animales y vincula el mismo a los logros científicos. La mayoría de centros tienen establecidos seminarios científicos, que pueden adaptarse a la experimentación animal. En el CIEMAT esta iniciativa ha sido siempre muy bien valorada por nuestro personal.

SEGURIDAD EN 5'

- **Reuniones periódicas, individualizadas, de los responsables con el personal del animalario:** para comentar problemas, propuestas, preocupaciones y mostrarles valoraciones de su desempeño. Esta iniciativa de Joana Visa incide muy positivamente en la participación de los trabajadores y su valoración.
- **Actualizaciones internas de protocolos, con presentación y discusión entre los trabajadores:** en nuestro caso, tras bandear algunas tensiones, acabaron resultando positivas entre los trabajadores.

De manera general, la relación de estas características de la organización con los elevados niveles de *Burnout* es generalizable en cuanto al nivel de agotamiento emocional y de despersonalización; pero, con la excepción de la ambigüedad de rol, esta relación es mucho menos importante con el nivel de baja realización personal.

Un estudio de Koeske y Koeske (1989) sobre la relación con distintas personas ofrece resultados contradictorios. Si nos fijamos en el número de casos distintos atendidos, suponen un elevado nivel de carga y de presión temporal (factores estresores relacionados con el trabajo). En cambio, si nos fijamos en la dificultad de la relación con personas complicadas y con problemas diferentes, se detecta una modesta relación positiva con el *Burnout* cuanto más difíciles son las relaciones.

Se ha observado que el trabajo frecuente con pacientes o clientes difíciles hace que se desarrollen mecanismos adaptativos que previenen los efectos negativos a largo plazo, como el *Burnout*.

Sólo a nivel de "broma", seamos pacientes con los compañeros investigadores super-exigentes o pejugueras. ¡Están contribuyendo a mejorar nuestro *Burnout*!

Fuente Prevención Integral & ORP



Más de 400 socios relacionados con el sector de los animalarios

Anúnciate en nuestra revista.

publicidad.revista@secal.es

 sociedad española para las ciencias del animal de laboratorio

Técnicas de manejo no aversivo en la rata

Violeta Solís, Cristina Muñoz, Rubén Díaz Viso, Ángeles Talavante y Magdalena Jiménez
GlaxoSmithKline I+D DDW-IVSD

Palabras clave: bienestar, manejo, inmovilización.

Recientemente, hemos hablado del manejo no aversivo en el ratón y ahora le toca el turno a la rata. En general, las ratas dan más miedo que los ratones, sobre todo cuando no se tiene mucha experiencia trabajando con ellas. No es sorprendente, porque la rata es mucho mayor y más fuerte, y tiene unos dientes considerablemente más grandes. Sin embargo, en lo que más se parecen ratas y ratones es en su morfología, porque respecto a su comportamiento son bastante diferentes. A pesar de su tamaño y del miedo que puedan dar, las ratas de laboratorio son animales dóciles, con muy buen carácter y que se acostumbran rápidamente a nosotros. Para facilitar que esto sea así, se deben tratar con cuidado y manipular e inmovilizar adecuadamente. En este artículo vamos a ver cómo podemos hacer esto.

INTRODUCCIÓN

La rata de laboratorio es un animal inteligente y sociable. Esto se refleja en su conducta y, cuando se la trata adecuadamente, en su tolerancia al manejo y a la inmovilización. Las ratas suelen ser dóciles, especialmente, si se les manipula de forma regular desde una edad temprana. Es fundamental que se maneje e inmovilice a las ratas de manera correcta, principalmente, para prevenir cualquier daño que se les pueda hacer, pero también porque favorecerá que estén más tranquilas, facilitando así nuestro trabajo.

Las ratas, al contrario que los ratones, sólo muerden en situaciones muy concretas y en ocasiones esto puede indicarnos que están sufriendo mucho dolor o malestar. Debemos tener especial cuidado con las hembras con crías y con los machos de edad avanzada. Quitando estas dos excepciones, es muy raro que una rata nos muerda si la manejamos adecuadamente, a no ser que se encuentre muy enferma o sufra un dolor fuerte. Así, si nos encontramos con una rata que intenta mordernos de manera defensiva, debemos considerarlo una señal de alarma que puede indicarnos que el animal no está bien. Sin embargo, debemos

distinguir los mordiscos defensivos de los “mordisqueos” exploratorios o de juego. Cuando una rata nos mordisquea los dedos sin llegar a apretar, debemos alegrarnos porque es un indicativo de que está relajada y mostrando una actitud positiva hacia nosotros. Cloutier y colaboradores¹ observaron que una de las conductas más habituales cuando les hacemos “cosquillas” a las ratas y estas responden positivamente a las mismas es, precisamente, el acercamiento voluntario a la mano y el mordisqueo de los dedos. Vamos a comentar lo de las “cosquillas” en detalle más adelante.

Todos los estudios con animales pasaron por una revisión ética y se realizaron de acuerdo al Real Decreto 53/2013 y a la política corporativa sobre Cuidado, Bienestar y Trato a los animales de GSK.

EVITAR LA COLA

Como con los ratones, se debe evitar coger a las ratas de la cola para sacarlas de la jaula. Cogerlas de la cola va a causarles miedo y la próxima vez que queramos cogerlas, nos resultará más difícil porque huirán de nosotros. Además, las ratas pesan bastante y podemos llegar a hacerles daño en la cola si se quedan suspendidas de ella.

En vez de por la cola, podemos coger a la rata del tórax, bien de forma dorsal, rodeando sus escapulas y hombros con la palma de nuestra mano y situando los dedos por debajo; bien de forma ventral, situando la mano por debajo del cuello y deslizándola desde la cabeza hacia el tórax, situándola entre la rata y la viruta (ver Figura 1). De la primera manera, obtendremos un mejor agarre, lo que es adecuado si la rata no está acostumbrada a la manipulación o nosotros no estamos familiarizados con el agarre ventral. El agarre ventral es menos firme, pero puede ser especialmente útil cuando tenemos animales operados con un catéter vascular (ver Figura 2).

AL CUIDADO

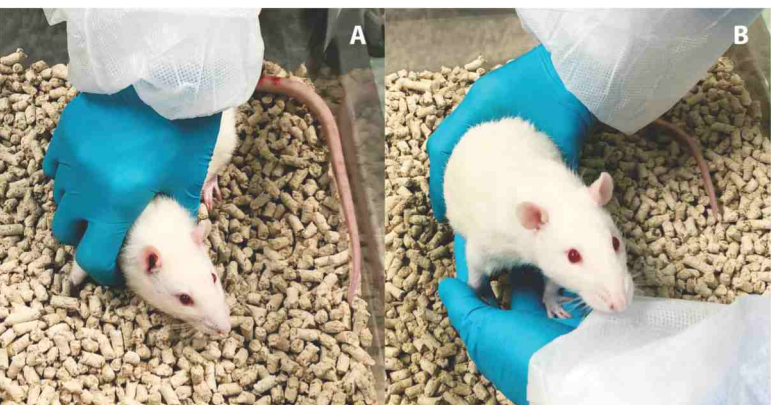


Imagen suministrada por la autoría

Figura 1.- Manejo de la rata evitando el uso de la cola. **A.** Agarre dorsal. **B.** Agarre ventral. El enriquecimiento se ha retirado para una mejor visibilidad. Fotos de los autores.

En ambos casos es fundamental que, al levantar a la rata de la superficie en la que se encuentra, se apoyen las patas traseras en la otra mano (ver Figura 2). Tener las extremidades traseras en el aire es algo que altera mucho a las ratas y en cuanto notan que esto ocurre, comienzan a agitarse para buscar apoyo.



Imagen suministrada por la autoría

Figura 2.- Para sacar a la rata de la jaula, una mano sujeta el área torácica y en la otra se apoyan las patas traseras. **A.** Sujeción ventral de una rata canulada, con el lomo afeitado por motivos experimentales. **B.** Sujeción dorsal de una rata canulada evitando poner la mano sobre el catéter. El enriquecimiento se ha retirado para una mejor visibilidad. Fotos de los autores.

INMOVILIZACIÓN

La inmovilización también es fundamental para asegurar tanto el bienestar de los animales como una buena técnica experimental. La sujeción debe ser suficiente para evitar que el animal se mueva y pueda hacerse daño con la aguja, sonda, etc. en la administración o en la toma de muestras, pero no excesiva para

evitar causarle daño, ansiedad o miedo. Stuart and Robinson publicaron en 2015² un estudio muy interesante donde se investigaba el efecto de la inmovilización para la administración intraperitoneal (ip) en rata. Las investigadoras prueban una técnica de inmovilización donde el animal está más libre y observan que, en gran medida, el estrés causado por la administración ip se debe más a la inmovilización en sí que al pinchazo de la aguja. Al inmovilizar a las ratas con esta técnica (ver Figura 3B) observan una menor elevación de la corticosterona, un menor número de vocalizaciones y una menor oposición a la inmovilización en comparación con las ratas inmovilizadas de la manera habitual. Stuart *et al.*³ mostraron, además, que las ratas inmovilizadas con la técnica de inmovilización más libre tenían un mejor estado afectivo que las ratas inmovilizadas con la técnica convencional (ver Figura 3A).



Imagen suministrada por la autoría

Figura 3.- A. Inmovilización convencional de la rata para una administración. **B.** Inmovilización de la rata con la técnica propuesta, donde la rata tiene mayor capacidad de movimiento. Imagen de Stuart and Robinson (2005), bajo licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0.

En nuestro caso, hemos de decir que no hemos sido capaces de utilizar la técnica descrita para la inmovilización. Sin embargo, sí que observamos que las ratas están mucho más tranquilas si se les da cierta libertad de movimiento durante la inmovilización y la posibilidad de esconder la cabeza debajo de la mano o en el hueco del brazo (ver Figura 4). También hemos detectado que es fundamental evitar los ruidos, especialmente, los ruidos metálicos contra la mesa del laboratorio, para evitar asustar a las ratas y que se muevan bruscamente.



Imagen suministrada por la autora

Figura 4.- Sujeción de la rata durante la obtención de muestras de sangre, donde se le da la libertad de colocarse en la posición que prefiera. **A.** La rata prefiere colocar la cabeza en el hueco del brazo. **B.** La rata esconde la cabeza bajo la mano. **C.** y **D.** Las ratas prefieren asomar la cabeza. Fotos de los autores.

COSQUILLAS

Una forma de facilitar el bienestar de las ratas en los procedimientos experimentales es utilizar el juego para crear una relación de confianza y relajar a los animales. LaFollete y colaboradores^{4,5} han desarrollado una técnica para realizar "cosquillas" a las ratas, lo que se denomina de forma más científica "juego heteroespecífico". El método se basa en los movimientos de juego intraespecíficos de la rata y fue desarrollado, inicialmente, por el neurocientífico Jaak Panksepp, quien lo utilizó para estudiar los estados afectivos en las ratas^{6,7}. Realizando las cosquillas antes de los procedimientos experimentales, se consigue que los animales estén más tranquilos y que el procedimiento resulte menos estresante^{1,8}. También se pueden utilizar para mejorar el bienestar de las ratas que deben alojarse solas por razones experimentales⁹.

Las cosquillas constan de tres pasos: 1) realizar un movimiento rápido con los dedos sobre la zona de las escápulas de la rata, 2) coger a la rata de los hombros y tumbarla boca arriba, 3) realizar el movimiento rápido con los dedos sobre el pecho de la rata (ver Figura 5). Durante todo el proceso se debe evitar tocar los flancos traseros y el área ventral, al ser las zonas donde se dirige la agresión en las peleas entre ratas. La técnica de las cosquillas no es sencilla, se debe encontrar el equilibrio entre no ser demasiado suave, ya que el juego entre ratas es bastante vigoroso, y no hacer daño o asustar a las ratas. Como es de esperar, funciona mejor con animales jóvenes. Con tres sesiones diarias de 15 segundos durante tres días consecutivos es suficiente para que las ratas se acostumbren y respondan positivamente al juego interespecífico, de tal manera que se pueda usar como refinamiento en los procedimientos experimentales.



Imagen suministrada por la autora

Figura 5.- Haciendo cosquillas a una rata. **A.** Paso 1, donde se realiza un movimiento rápido de los dedos sobre las escápulas. **B.** Paso 3, donde se le ha dado la vuelta a la rata y se hacen las cosquillas sobre la zona del pecho. Fotos de los autores.

Nosotros hemos intentado aplicarlo y hemos observado bastante variabilidad en la respuesta de las ratas. Algunas responden muy bien y buscan la mano para seguir jugando. Otras se asustan mucho y se nota que se quedan completamente paralizadas. Por ello, es fácil identificar cuando la técnica está funcionando bien: la rata debe tener una postura relajada, debe acercarse de manera voluntaria a la mano o seguirla y a menudo morder suavemente los dedos de la persona con la que juega. Si disponemos de un detector de ultrasonidos, podremos además escuchar las vocalizaciones de juego, que se encuentran en el rango de los 50 kHz (ver Figura 6).



Imagen suministrada por la autoría

Figura 6.- Cuando las ratas responden positivamente al juego heteroespecífico o cosquillas, realizan vocalizaciones de 50kHz, se aproximan a la mano y mordisquean los dedos. **A.** Medición de las vocalizaciones con un detector de murciélagos. **B.** Rata mordisqueando los dedos de la mano sin apretar. Fotos de los autores.

La parte más difícil de realizar adecuadamente en las cosquillas sin producirle miedo a la rata es el momento de darle la vuelta. Nosotros hemos observado que a menudo es preferible evitar ese paso, aunque de acuerdo a las autoras de la técnica, no estaríamos realizando realmente “juego heteroespecífico” si nos saltamos este paso. Si os interesa realizar esta técnica, podéis encontrar más información en <https://na3rsc.org/rodent-handling/> donde podéis descargaros un folleto en castellano y acceder a una certificación como “cosquilleador” de ratas (en inglés).

UN PROGRAMA COMPLETO: HABITUACIÓN AL MANEJO, ADIESTRAMIENTO Y MEJORA DEL ALOJAMIENTO

Un ejemplo extraordinario de lo bien que puede llegarse a hacer el manejo es el trabajo realizado en el Instituto de Investigación de Suecia (RISE) y que ha recibido un premio de refinamiento de la EPAA (*European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing*) en 2017 y un premio de FELASA en 2018. Pueden verse vídeos del manejo de rata y ratón en su página web, os los recomendamos porque realmente son el objetivo al que todos deberíamos intentar llegar www.ri.se/en/what-we-do/expertises/3r-refinement. En el caso de las ratas, desde el principio del vídeo podemos ver como las cogen del cuerpo y evitan el uso de la cola. Ponen a las ratas sobre una manta de peluche y las acarician con suavidad en la cabeza para acostumbrarlas al manejo. Su objetivo es crear una relación de confianza entre las ratas y las personas que trabajan con ellas. Durante la habituación al manejo, resaltan la importancia de

identificar las diferencias entre individuos y tratar a las ratas de acuerdo a estas diferencias. De hecho, es algo que tienen en cuenta a la hora de realizar los muestreos y algunas ratas se muestrean sobre la manta, mientras que otras prefieren estar dentro de un refugio tintado en rojo.

Es increíble ver cómo las ratas siguen al técnico que está con ellas como si fueran animales de compañía. Para acostumbrarlas a las técnicas, durante la habituación al manejo, tocan y acarician las zonas de donde se van a obtener las muestras, como las patas y la cola. Además, las adiestran mediante refuerzo positivo, utilizando una pasta grasa que les gusta mucho y en ocasiones también un *clicker*^a. Es una maravilla ver cómo las ratas permiten que se les coja una muestra de sangre sin inmutarse ante el pinchazo y sin tener que inmovilizarlas en absoluto.

Alojan a las ratas en jaulas modificadas de conejo donde, además de tener mayor superficie, tienen mucho más espacio vertical, algo que escasea en las jaulas convencionales de rata. El espacio vertical es fundamental en rata y es el gran olvidado. Las ratas necesitan ponerse de pie, tanto por razones físicas (estirarse) como etológicas (monitorización del ambiente). Se ha observado que es una conducta que realizan con mucha frecuencia si se les da la oportunidad y que si no pueden realizar compensan con estiramientos horizontales¹⁰. Este tipo de alojamiento puede favorecer un estado afectivo más positivo en las ratas¹¹, lo que podría facilitar el manejo, al igual que el uso de cosquillas.

NUESTRA EXPERIENCIA

A nosotros nos encantaría conseguir lo que están haciendo en el RISE, así que paso a paso estamos implementando una serie de cambios con respecto al alojamiento y al manejo de rata. El año pasado empezamos a utilizar las jaulas de dos pisos de Tecniplast (GR1800) y ha sido un cambio muy positivo para los animales. Para empezar, las ratas tienen mucho más espacio, tanto en superficie como verticalmente, además de tener la opción de subir al “piso” superior para descansar o explorar. Un elemento muy bueno de esta jaula es que tiene una puerta en la parte superior. Esto supone que no es necesario retirar la tapa de la jaula para acceder a las ratas, por lo que se asustan menos al interactuar con ellas (ver Figura 7).

^a Un *clicker* es un aparato que recibe su nombre del sonido que emite (*click*) y que se utiliza para facilitar el adiestramiento. Los animales asocian su sonido a un premio, por lo que permite una asociación temporal más precisa entre el premio y la conducta que se quiere reforzar.



Imagen suministrada por la autoría

Figura 7.- A. Ratas subidas a la plataforma. B. Ratas de pie, asomadas a la puerta de la jaula de dos pisos. Fotos de los autores.

Además, las estamos acostumbrando con premios a que se acerquen a la parte delantera de la jaula para facilitar cogerlas sin causarles estrés (ver Figura 8). De los premios que hemos probado, uno de los preferidos por las ratas son unas bolas de chocolate con el nombre de *Supreme MiniTreats*. Tienen la ventaja de estar certificadas y de pesar exactamente 1 gramo cada una. Esto facilita el control de la dieta en caso de que sea necesario por motivos experimentales. Es importante controlar la cantidad que se les da para evitar que cojan demasiado peso. Recomendamos no darles más de una si se les da diariamente y no más de dos si se les da en días alternos.

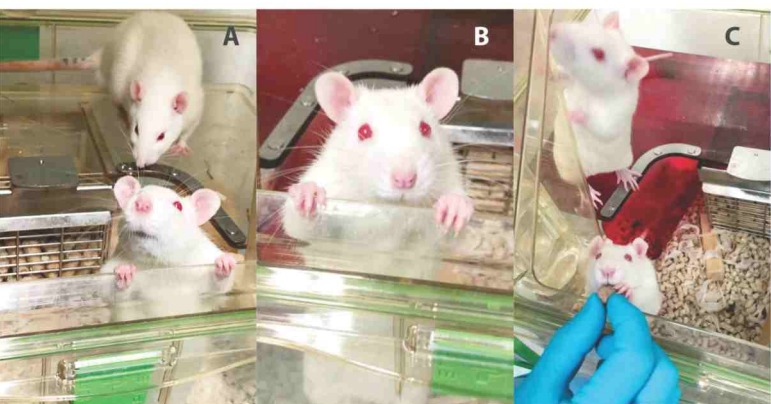


Imagen suministrada por la autoría

Figura 8.- A. y B. Ratas asomadas a la puerta de la jaula esperando a recibir una bola de chocolate. C. Rata cogiendo la bola. Fotos de los autores.

También estamos empezando a implementar la habituación al manejo. Compramos una manta de peluche (*VetBed*; ver Figura 9) de tamaño grande y la cortamos en cuadrados más pequeños,

similares a los utilizados en el video del RISE. Colocamos a las ratas sobre la manta y las acariciamos durante 1-2 minutos. Dependiendo de cómo responden, podemos ser más vigorosos o más suaves. Comenzamos la habituación el mismo día de la llegada de los animales y continuamos durante todos los días hasta el comienzo del trabajo experimental. El periodo de aclimatación es suficiente para habitar a las ratas al manejo antes de comenzar los estudios. Hemos empezado este año con la cepa Wistar y los resultados han sido muy buenos. Las ratas han estado muy tranquilas en todo momento, lo que nos ayudó a la hora de sacarlas de la jaula el día del experimento y también a la hora de inmovilizarlas para la dosificación y el muestreo. Curiosamente, comparadas con las ratas control que no habíamos habituado al manejo, las ratas habituadas eran más activas y curiosas. Esto creemos que se debe a que las ratas control tenían más miedo y se quedaban paralizadas al realizar la administración. También observamos que las ratas habituadas no defecaban en el *VetBed*, mientras que las ratas control sí, lo que de nuevo podría interpretarse como que las ratas habituadas tienen menos miedo que las controles.

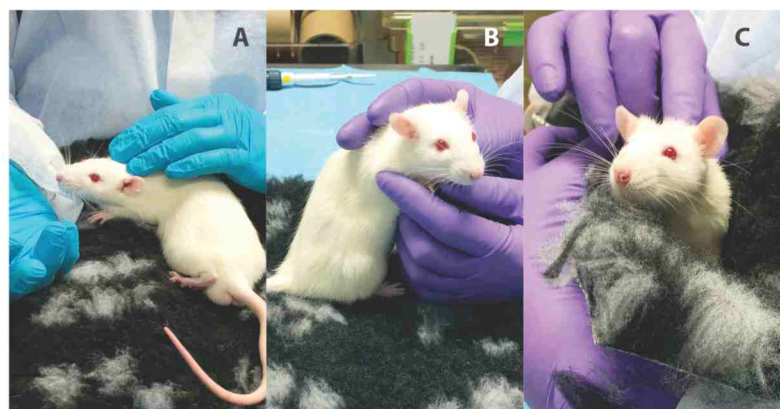


Imagen suministrada por la autoría

Figura 9.- Manejo de las ratas con la manta *VetBed*. A. Habituación al manejo el día siguiente a la llegada. B. y C. Manejo durante la administración y muestreo en un ensayo de PK. Fotos de los autores.

CONCLUSIONES

Un buen manejo de los animales de laboratorio es fundamental para asegurar su bienestar, una buena ejecución de los procedimientos y la seguridad del personal técnico. Las ratas son animales dóciles que responden muy bien a un manejo adecuado. Como en el ratón, debemos evitar el uso de la cola para sacar a las ratas de la jaula. En el caso de la rata, las diferencias interindividuales son importantes porque hay ratas más miedosas

AL CUIDADO

y otras que en seguida querrán interactuar con nosotros. Mediante la habituación al manejo, realizando una inmovilización cuidadosa, utilizando el adiestramiento en positivo cuando sea necesario y refinando el alojamiento, podremos conseguir que los procedimientos experimentales y de cuidado sean una experiencia mucho más positiva para todos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cloutier S., Panksepp J., and Newberry R.C. *Playful handling by caretakers reduces fear of humans in the laboratory rat*. Applied Animal Behaviour Science. 2012;140(3-4):161-71.
2. Stuart S.A. and Robinson E.S.J. *Reducing the stress of drug administration: implications for the 3Rs*. Scientific Reports. 2015;5:14288.
3. Stuart S.A., Butler P., Munafo M.R., et al. *Translational rodent assay of affective biases in depression and antidepressant therapy*. Neuropsychopharmacology. 2013;38:1625-35.
4. LaFollete M.R., O'Haire M.E., Cloutier S., et al. *Rat tickling: a systematic review of applications, outcomes, and moderators*. PLoS ONE. 2017;12(4):e0175320.
5. LaFollete M.R., O'Haire M.E., Cloutier S., et al. *Practical rat tickling: Determining an efficient and effective dosage of heterospecific play*. Applied Animal Behaviour Science. 2018;208:82-91.
6. Panksepp J. and Burgdorf J. *50-kHz chirping (laughter?) in response to conditioned and unconditioned tickle-induced reward in rats: effects of social housing and genetic variables*. Behavioural Brain Research. 2000;115(1):25-38.
7. Panksepp J. and Burgdorf J. *"Laughing" rats and the evolutionary antecedents of human joy?* Physiology & Behavior. 2003;79(3):533-47.
8. Cloutier S., Wahl K.L., Panksepp J., et al. *Playful handling of laboratory rats is more beneficial when applied before than after routine injections*. Applied Animal Behaviour Science. 2015;164:81-90.
9. Cloutier S., Baker C., Wahl K., et al. *Playful handling as social enrichment for individually- and group-housed laboratory rats*. Applied Animal Behaviour Science. 2012;143(2-4):85-95.
10. Makowska I.J. and Weary D.M. *The importance of burrowing, climbing and standing upright for laboratory rats*. Royal Society open science. 2016;3:160136.
11. Makowska I.J. and Weary D.M. *Differences in anticipatory behaviour between rats (Rattus norvegicus) housed in standard versus semi-naturalistic laboratory environments*. PLoS ONE. 2016b;11(1):e0147595.

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

ESTAMOS
EN EL CENTRO DE
LA INVESTIGACIÓN
EN HABLA
HISPANA.



Sociedad española
para las ciencias
del animal de laboratorio

www.secal.es

Desde el ratón, y otros amigos, al humano: entendiendo a SARS-CoV-2

Ruth Henríquez Cabrera y Josefa Cabrero Hurtado

Departamento de Genética, Universidad de Granada

Palabras clave: SARS-CoV-2, sensibilización, transgenia.

Con la aparición de una nueva variante de coronavirus amenazando a la humanidad, la ciencia ha tenido que jugar una interesante carrera contrarreloj. Tras la secuenciación del genoma del virus y la caracterización de la proteína espicular de superficie (proteína S, del inglés *spike*), que le permite interactuar con el receptor de la célula hospedadora, la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2)¹, empezaron los estudios farmacológicos y fisiopatológicos (ver Figura 1).

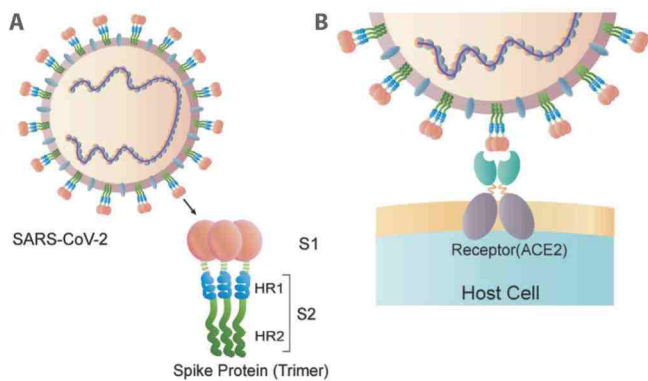


Figura 1.- A. Estructura trimérica de la proteína de superficie espicular de SARS-CoV-2. B. Estructura de la enzima convertidora de angiotensina 2 de la célula hospedadora. Fuente: Huang *et al.* (2020).

Uno de los primeros acercamientos que podían tener los investigadores a la infección por SARS-Cov-2 era la experimentación y observación en animales. Los primeros modelos fueron en ratón (*Mus musculus*) con la utilización del virus SARS-CoV-2 mutado con una mayor afinidad para la proteína de superficie ACE2, mediante la cual el virus es capaz de ingresar a la célula. Esta adaptación terminó generando diferentes sintomatologías aún más severas, permitiéndose el estudio de la patogénesis desde un punto de vista amplio. Sin embargo, se observó que los anticuerpos monoclonales generados en

respuesta al virus en los tejidos pulmonares del ratón no neutralizaban la variante salvaje o no mutada. Por ello, el siguiente paso fue plantearse la modificación genética de los animales, generando ratones humanizados con el gen ACE2, o bien ratones más susceptibles al virus. En el primer escenario, el gen *ace2* se reemplazó por el gen ACE2 humano, pero el cuadro sintomatológico resultó mucho más leve de lo que cabía esperar. En el segundo escenario, a los ratones se les aumentó la susceptibilidad al virus mediante dos planteamientos: primero, la exposición del virus mediante transducción, usando adenovirus o virus adeno-asociados portadores de ACE2 humano; y segundo, mediante la generación de ratones recombinantes de cepas puras o endogámicas de *Mus musculus* cuya resistencia al virus era menor. Ambos escenarios combinados generaron resultados más prometedores para la investigación, aun cuando la expresión del virus no se producía en los tejidos pertinentes u observados en humanos.

Mamíferos como el hámster de Siria (*Mesocricetus auratus*) o los hurones (*Mustela putorius furo*) fueron considerados buenos candidatos para nuevos modelos en investigación de COVID-19. Ambos presentaban una sensibilidad natural frente a virus respiratorios bastante alta, por lo que los modelos con estos dos animales resultaron ser bastante gratificantes, produciéndose una alta replicación del virus en las vías respiratorias. En los modelos propuestos con hámsteres de Siria, se pudo incluso observar las diferencias demográficas más notorias en la propia población humana, como el desarrollo de formas más agresivas de la enfermedad en machos de avanzada edad frente a hembras y jóvenes. La transmisibilidad también se estudió en ambos modelos, siendo un punto clave en la lucha contra la propagación del virus².

Sabemos que la familia de virus Coronaviridae es característica en animales, capaz de generar grandes zoonosis,

¿Y TÚ QUÉ OPINAS?

por lo que el estudio en animales y la generación de modelos experimentales puede ser muy extenso por su presencia en muchas especies y grupos³. A pesar del amplio catálogo, en estos tres candidatos, se han obtenido resultados muy prometedores y se debe seguir investigando.

¿Y tú qué opinas?

¿Por qué crees que los anticuerpos monoclonales en ratones no humanizados no neutralizaban la variable salvaje del virus?

¿A qué se puede deber la expresión irregular en ratones humanizados?

¿Se podrían conseguir observar todos los efectos causados en humanos en modelos con ratones?

En primer lugar, se comprobó que estos anticuerpos monoclonales sí que eran capaces de neutralizar la variante inicial del virus, y lo que se vio en este modelo fue un falso negativo. Las

mutaciones que se generan en la proteína espicular del virus para producir una mayor afinidad al receptor ACE2 de los ratones se encuentra en el dominio de unión y diana para la respuesta de neutralización a anticuerpos. Por tanto, aunque puede ser interesante esta opción para el ensayo de vacunas y medicamentos, presentó esta falla.

En cuanto a los ratones humanizados, el hecho de que estos posean en su genoma el gen ACE2 humano hace que se dé una expresión ectópica del mismo, expresándose así en tejidos o células donde, normalmente, no se expresaría. Esto no ocurre únicamente en ratones transgénicos permanentemente, sino también en aquellos modificados para ser susceptibles a SARS-CoV-2 mediante adenovirus.

Para concluir, es cierto que se han observado en ratones muchas de las características de la enfermedad, tal y como se presenta en humanos, pero nunca todas a la vez. Esto se debe en parte a que no se ha conseguido un modelo en ratones que los unifique (ver Tabla 1).

Tabla 1.-Se observa que en los experimentos con ratones no se ha conseguido obtener la sintomatología esperada, mientras que en modelo de hámster y hurón sí. La replicación del virus en los distintos tejidos de los modelos en ratones no se consigue en todos los casos. *SDRA*: Síndrome de distrés respiratorio agudo. Fuente: Tabla modificada de Muñoz-Fontela *et al.* (2020).

Tratamiento	Organismo
Replicación vírica	
Tracto respiratorio superior	Humanos, ratones, hurones, primates no-humanos, visones, gatos y murciélagos
Tracto respiratorio inferior	Humanos, ratones, hámsteres, hurones y primates no-humanos
Otros órganos	Humanos (tracto GI, SNC y riñón), ratones hACE2 (SNC), hámsteres, hurones y primates no humanos (tracto GI)
Signos clínicos	
Fiebre	Humanos y hurones
Descarga nasal	Humanos y hurones
Dificultad respiratoria	Humanos y hámsteres

¿Y TÚ QUÉ OPINAS?

ANIMALES DE LABORATORIO

VERANO 2021 / NÚMERO 90

Tratamiento	Organismo
Neumonía	
Afección pulmonar bilateral	Humanos, hámsteres y primates no-humanos
Opacidades pulmonares	Humanos, hámsteres y primates no-humanos
Edema focal e inflamación	Humanos, hámsteres, hurones y primates no-humanos
SDRA	Humanos
Transmisión	Humanos, hámsteres, hurones, gatos y murciélagos
Inmunología	
Seroconversión	Humanos, ratones, hurones hámsteres, primates no-humanos y murciélagos
Neutralización de anticuerpos	Humanos, ratones, hámsteres, hurones y primates no-humanos
Inmunidad de células T	Humanos, ratones, hurones y primates no-humanos
Citoquinas pro-inflamatorias	Humanos, ratones y primates no-humanos
Demografía	
Enfermedad más severa en machos	Humanos y hámsteres
Enfermedad más severa en individuos de mayor edad	Humanos, hámsteres y primates no-humanos

BIBLIOGRAFÍA

1. Huang Y., Yang C., Xu X., et al. *Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19*. Acta Pharmacologica Sinica. 2020;41:1141-9.
2. Muñoz-Fontela C., Dowling W.E., Funnell S.G.P., et al. *Animal models for COVID-19*. Nature. 2020;586(7830):509-15.
3. Siddell S.G. *The Coronaviridae*. The Viruses. Springer, Boston, MA. 1995.

Low-flow electronic vaporizers

SomnoFlo®

Like traditional, but better



Features & Benefits of Low-Flow

- **Low flow rates**
Saves money by using less than 1 mL/hr of isoflurane
- **Built-in air compressor**
Uses room air or compressed gas
- **Automated anesthetic delivery system**
Ensures precision to 0.1% delivery of anesthetic
- **No servicing or calibration needed**
Cost-effective, reliable equipment
- **Induction chamber purge**
Minimizes WAG exposure



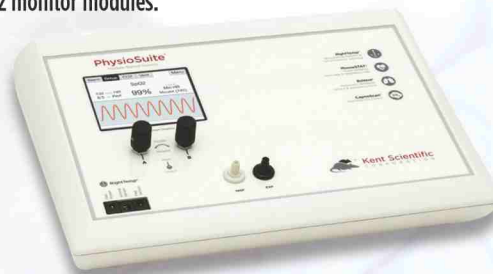
SomnoSuite®

All-in-one system, ideal where space is limited

Physiological monitoring

PhysioSuite®

Multi-physiological monitor with far infrared warming and temperature control, and optional pulse oximeter and heart rate monitor, ventilator and end-tidal CO2 monitor modules.



Features & Benefits

- **Intuitive touch screen control**
Easy to use
- **Pulse oximetry and heart rate module**
Accurately measure heart rates up to 900bpm
- **Temperature monitor and homeothermic control module**
Safely warm the animal without overheating
- **Automated ventilator module**
Ventilate animals from 3g to 1,250g
- **End-tidal CO2 and respiratory rate module**
Delivers clear, accurate capnogram

Noninvasive blood pressure monitors

CODA®

CODA Monitor - 1 Animal



High throughput system Systems for 2, 4, 6 or 8 animals.
(network up to 48 animals)

- Measure both awake and anesthetized animals
- 8 gram mice to 950 gram rats
- Systolic, diastolic, mean BP and heart rate
- Diastolic BP measured, not calculated
- Easily measure dark-skinned, C57/BL6 mice
- MRI compatible



Kent Scientific
CORPORATION

For more information, visit sodispan.com
Sodispan Research s.l. exclusive representative in Spain and Portugal

El mosquito como animal de laboratorio II

David Calvo¹, Noemí Magán¹, Sara Viera¹ y Julia Sánchez²

¹In Vivo Biology, GlaxoSmithKline I+D DDW

²In Vivo Science and Delivery, GlaxoSmithKline I+D DDW

Palabras clave: malaria, *Plasmodium spp*, vector.

INTRODUCCIÓN

La malaria es una de las enfermedades humanas más importantes transmitidas por vectores. En 2019 se registraron unos 229 millones de casos de malaria en los 87 países donde la malaria es endémica (Informe de la Organización Mundial de la Salud 2020). Aunque, en las últimas décadas, se ha realizado un gran esfuerzo para controlar esta enfermedad desarrollando programas de control específicos, tanto del parásito que la causa como del vector que lo transmite, existiendo numerosos factores que han hecho imposible la erradicación total de la enfermedad. Factores socioeconómicos asociados a los países donde la enfermedad es endémica, así como factores biológicos relacionados con el desarrollo de resistencias a los tratamientos aplicados han propiciado que la malaria aún constituya un problema de salud importante en muchos países de África, Sudamérica o Asia.

El desarrollo de nuevos enfoques para atacar la enfermedad y superar esas resistencias es un objetivo clave para su futura erradicación. El desarrollo de medicamentos que se dirijan a las etapas de transmisión del parásito de la malaria por el mosquito es una de las principales estrategias para la erradicación mundial de la malaria (Smith y colaboradores¹). En GlaxoSmithKline Investigación y Desarrollo España (GSK I+D España, compañía farmacéutica dedicada al descubrimiento y desarrollo de medicamentos para combatir enfermedades de países en vías de desarrollo), se ha establecido una plataforma de investigación para desarrollar nuevas moléculas antipalúdicas que muestren potencial en la prevención y/o el bloqueo de la transmisión de la enfermedad.

De las cuatro especies diferentes de *Plasmodium* que infectan a los seres humanos (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium ovale*), en nuestras instalaciones mantenemos de manera continua cultivos *in vitro*

del parásito *P. falciparum*, en laboratorios de nivel de bioseguridad 3. Así mismo, hace nueve años establecimos un insectario para la cría del mosquito *Anopheles stephensi*², vector importante de malaria para las especies *P. falciparum* y *P. vivax*, con una distribución geográfica que se extiende desde el Medio Oriente a través del subcontinente indio hasta China (Singh y colaboradores³).

El disponer en nuestras instalaciones tanto del parásito como del vector nos permite desarrollar ensayos de evaluación de moléculas que tengan efecto frente a los estadios de malaria en el mosquito y, así, prevengan y/o reduzcan la transmisión de la enfermedad.

CICLO BIOLÓGICO DE *P. falciparum*

El ciclo de *P. falciparum* pasa por dos hospedadores, el ser humano y el mosquito (ver Figura 1). En el ser humano, el parásito pasa por una etapa de reproducción asexual infectando los eritrocitos. En cierto momento, una parte de estos parásitos se diferencian en formas sexuales llamadas gametocitos, siendo la forma del parásito que ingiere el mosquito hembra cuando se alimenta de sangre en un ser humano. Cuando el mosquito ingiere los gametocitos, se produce un ciclo de reproducción sexual dentro de su estómago mediante el cual se forma un cigoto, y de éste un ooquineto que penetra en la pared del intestino del mosquito formando un quiste u oocisto. Dentro de este oocisto, se generan miles de esporozoitos que viajan y se acumulan hasta las glándulas salivales. Cuando este mosquito hembra se alimenta de sangre de un ser humano, inyecta estos esporozoitos junto con la saliva que viajarán por el torrente circulatorio hasta el hígado, constituyendo la fase hepática de la enfermedad. Una vez en el hígado, el esporozoito infecta a los hepatocitos multiplicándose dentro de ellos, generando nuevas formas asexuales que se liberan al torrente circulatorio, dando un nuevo ciclo de la enfermedad.

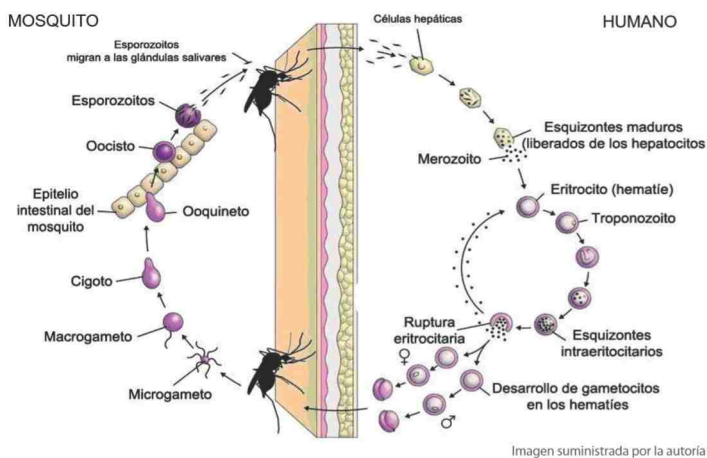


Imagen suministrada por la autoría

Figura 1.- Ciclo de *P. falciparum* donde se distinguen tanto las distintas fases del parásito como las formas infectivas en mosquito y humano. Imagen por Fundación IO.

EVALUACIÓN DE MOLÉCULAS FRENTE A MALARIA

Generalidades

En la actualidad, tenemos en marcha dos tipos de ensayos – tanto *in vitro* como *in vivo*– para la evaluación de moléculas frente a *P. falciparum*, en función del estadio del parásito: (1) frente a los estadios de malaria en el mosquito y (2) frente a los estadios hepáticos del parásito, determinando el potencial profiláctico o de cura radical de la enfermedad.

Para la realización de ambos ensayos, se transfieren 40 hembras de entre 5-6 días de edad de *An. stephensi* a unos contenedores cilíndricos de cartón de 4,5 cm de diámetro (fabricados y comercializados por Alenta, www.alenta.org), que poseen una doble malla en la parte superior. Estos mosquitos se mantienen en ayunas, sin la solución de azúcar ni agua durante las 24 horas previas a la realización del ensayo. De esta manera, incrementa la apetencia del mosquito por la sangre.

Evaluación *in vitro* de moléculas

De manera paralela a la producción de mosquitos, 16 días antes del ensayo, se generan en el laboratorio cultivos *in vitro* de gametocitos de *P. falciparum*. El día del ensayo, los mosquitos se alimentan de manera artificial con sangre infectada con los gametocitos del parásito mediante lo que se denomina ensayo estándar de alimentación por membrana (SMFA, del inglés *standard membrane feeding assay*). Es importante mantener la sangre infectada con el parásito a 37°C mediante un circuito cerrado de agua conectada a un “baño”. Encima de cada

contenedor con los mosquitos y formando parte de este circuito cerrado, se coloca un pequeño dispositivo de cristal con doble cámara que posee una membrana de Parafilm® en un extremo. Esta membrana, se coloca justo encima de la malla que posee el contenedor para permitir al mosquito alimentarse de la sangre infectada durante un periodo de tiempo de no más de 40 minutos (ver Figura 2).



Imagen suministrada por la autoría

Figura 2.- A. Vista de la alimentación artificial de mosquitos con sangre infectada con *P. falciparum* y tratados con diferentes compuestos y el baño que mantiene a 37°C el parásito. B. Vista en detalle de la alimentación de los mosquitos con sangre infectada con el parásito. Las muestras biológicas humanas han sido obtenidas de proveedores autorizados que cumplen con la formativa GSK y la extracción ha sido aprobada por los comités éticos pertinentes.

Tras haber alimentado a los mosquitos, son introducidos en un incubador con condiciones controladas de temperatura, humedad y fotoperiodo (26,5°C, 80% humedad relativa y un fotoperiodo con un ciclo de 10:14 oscuridad/luz). Los mosquitos se mantienen en estos contenedores por tiempo variable, en función del tipo de molécula que se quiera evaluar.

Evaluación de moléculas frente a los estadios de malaria en el mosquito

Para este ensayo, incubamos durante 48 horas en el laboratorio con distintas concentraciones de la molécula que se quiere evaluar, cultivos del parásito antes de usarlos para alimentar a los mosquitos. Tras este periodo de incubación, se alimentan y mantienen los mosquitos en el incubador como hemos descrito previamente (ver Figura 3). Siete días después, diseccionamos los mosquitos bajo una lupa para extraer el intestino medio, y lo teñimos con mercurocromo durante 10 minutos. En un portaobjetos para visualizar al microscopio, contamos el número de quistes u oocistos que ha formado el

parásito en el intestino del mosquito (ver Figura 4). Si la molécula evaluada es eficaz frente al parásito de malaria, el número de oocistos disminuye conforme aumenta la concentración de la molécula usada.

Con estos datos calculamos unos valores de IC_{50} (concentración necesaria del compuesto para producir un 50% de inhibición) para el porcentaje de bloqueo en la transmisión y el porcentaje de reducción en la intensidad de oocistos. Estos valores de IC_{50} nos permiten evaluar la potencia de la molécula usada.

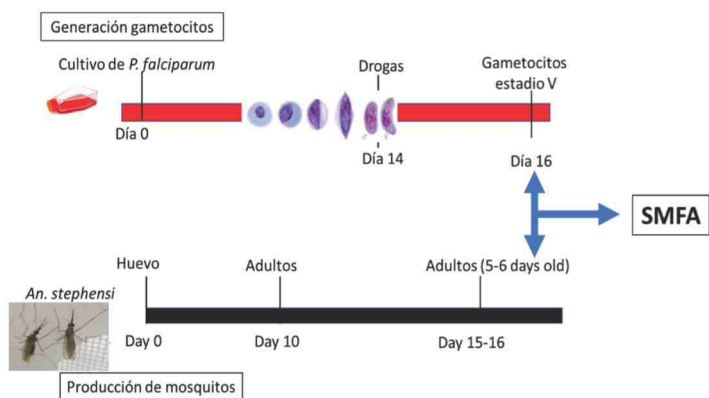


Imagen suministrada por la autoría

Figura 3.-Esquema temporal con los tiempos necesarios para la generación de cultivos de *P. falciparum* y producción de mosquitos usados a día 16 para la realización de un SMFA.

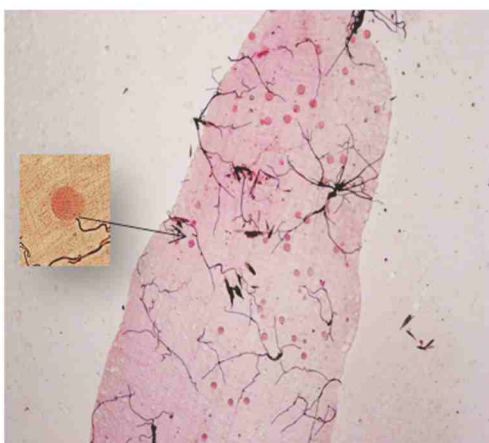


Imagen suministrada por la autoría

Figura 4.-Vista al microscopio 4x de intestino medio de mosquito teñido con mercurocromo 0,01%.

Evaluación de moléculas frente a los estadios hepáticos de malaria en el mosquito

Si lo que queremos evaluar son moléculas activas frente a los estadios hepáticos del parásito –esporozoitos (ver Figura 5)–, diseccionamos los mosquitos 16 días después de ser alimentados con sangre infectada con *P. falciparum* para extraer las glándulas salivales, y contamos el número de parásitos presentes en cada glándula. Este número depende del éxito en la infección del mosquito, de manera que en términos generales cada oocisto genera unos 1.000-5.000 esporozoitos. Los requerimientos de parásito son elevados: en un cultivo *in vitro* de hepatocitos humanos primarios sembrados en una placa de 384 pocillos, se necesitan un total de 20.000 esporozoitos por pocillo para la infección; es decir, que necesitamos unos 8 millones para cada ensayo.

Una vez que colocamos los parásitos en la placa, añadimos en cada pocillo la molécula seleccionada y evaluamos su efecto a un tiempo máximo de 6 días. Se cuenta el número de esporozoitos desarrollado en cada pocillo mediante análisis de imagen, para lo cual los fijamos y teñimos mediante un protocolo específico de inmunohistoquímica. Cuantos menos encontremos por pocillo, mejor es la eficacia del compuesto. La idea es encontrar moléculas activas que eviten el desarrollo del parásito dentro de los hepatocitos humanos.

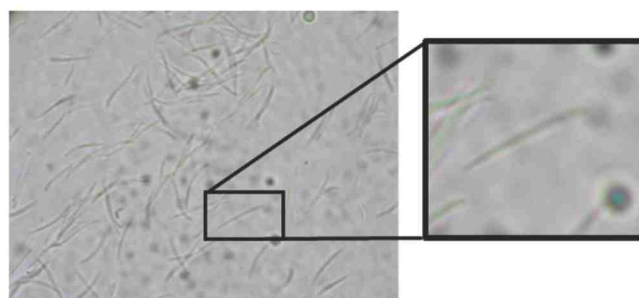


Imagen suministrada por la autoría

Figura 5.-Izquierda, vista al microscopio 100x de esporozoitos al ser liberados de las glándulas salivales. Derecha, vista al microscopio 100x de un esporozoito aislado.

Evaluación *in vivo* de moléculas

En GSK tenemos dos modelos de infección diferentes para estudiar la transmisión *in vivo* del parásito y el efecto que ejercen las moléculas ensayadas en este proceso. La diferencia entre ambos modelos es la especie de parásito con el que trabajamos: el parásito humano *P. falciparum*, o el parásito murino, *P. berghei*. Dependiendo de la especie con la que estemos trabajando, los

ensayos tienen protocolos y tiempos diferentes de crecimiento del parásito en el mosquito y el ratón.

Ambos modelos son usados para el estudio de compuestos con posible actividad antimalárica frente a los estadios hepáticos del parásito; ya sea para determinar el potencial profiláctico del compuesto (evitar la invasión del hígado), o para determinar su potencial de cura de la enfermedad. A continuación, describimos los ensayos realizados con el modelo de infección usando el parásito *P. berghei* para la búsqueda de compuestos con potencial profiláctico.

De manera habitual, las fases asexuales de los parásitos de malaria se mantienen congeladas a -140°C hasta su uso. Como paso previo al comienzo de un ensayo, realizamos la expansión de un vial; es decir, se descongela un vial de formas asexuales del parásito y se inyecta a ratones *Balb/c*. Un par de días después, utilizamos los parásitos que han crecido en estos ratones para infectar nuevos animales, y 3 días más tarde realizamos lo que llamamos “mosquito feeding” o ensayo directo de alimentación de los mosquitos (DFA, del inglés *Direct Feeding Assay*). Este estudio consiste en que los mosquitos piquen directamente a los ratones infectados, previamente anestesiados con una combinación de Ketamina/Xilacina. Para ello, colocamos a los ratones sobre la malla de los contenedores cilíndricos (detallados previamente) y que contienen a los mosquitos (ver Figura 6). Cada mosquito es capaz de ingerir entre 3 y 5 microlitros de sangre del ratón. Este proceso dura unos 30 minutos en oscuridad por ser el momento en que los mosquitos están más activos, y siempre a una temperatura y humedad controladas acorde con los requerimientos de desarrollo de *P. berghei*. Los ratones infectados usados son eutanasiados una vez terminada la alimentación de los mosquitos.



Imagen suministrada por la autoría

Figura 6.- A. Contenedores cilíndricos con los mosquitos hembra en su interior preparados para el DFA. **B.** Momento en el que se colocan los ratones infectados anestesiados. **C.** Los ratones, durante el DFA (se puede observar cómo les ponemos mantas eléctricas para que conserven el calor corporal). Todos los estudios con animales pasaron por una revisión ética y se realizaron de acuerdo al Real Decreto 53/2013 y la política corporativa sobre el Cuidado, Bienestar y Trato a los animales en GSK.

Tras haber sido alimentados con la sangre de los ratones infectados, los mosquitos se mantienen dentro de un incubador durante 21 días en condiciones controladas de temperatura, humedad y fotoperiodo (21°C , 80% humedad relativa y ciclo luz/oscuridad 10:14). La alimentación del mosquito consiste en algodones embebidos en solución de azúcar 10%. Durante este periodo, el parásito desarrolla su ciclo dentro del mosquito, evaluando la producción de oocistos a los 8-9 días después del DFA, y los esporozoitos para los ensayos son obtenidos después de 21 días de desarrollo en el mosquito.

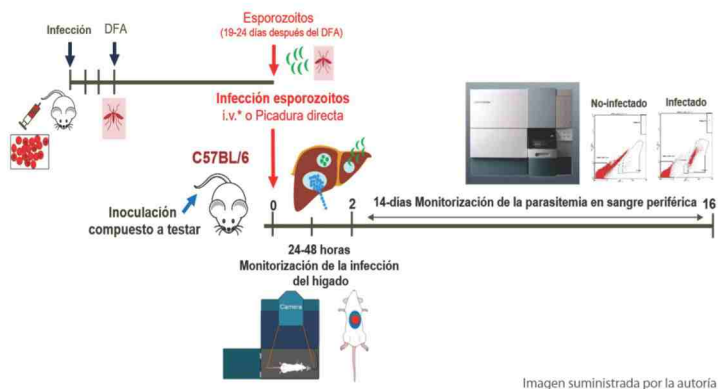


Figura 7.- Esquema temporal de los tiempos de incubación del parásito en el mosquito y del flujo de trabajo necesario para la realización del ensayo *in vivo*.

Evaluación de moléculas frente a los estadios hepáticos de malaria murina en el ratón

Una vez tenemos los esporozoitos desarrollados, infectamos ratones C57BL/6 sanos. Hay 2 formas: diseccionar las glándulas salivales de los mosquitos para extraer de manera manual los esporozoitos e inyectárselos por vía intravenosa (iv) a los ratones (2.000-20.000 esporozoitos/mosquito), o de forma natural, mediante picadura directa previa anestesia de los mismos (25 mosquitos/bote/ratón). El tratamiento de los ratones con los compuestos que queremos evaluar se realiza antes de la infección, para los compuestos con potencial actividad profiláctica, o a las pocas horas de haber realizado la inyección para evaluar compuestos con potencial de cura. Una vez inoculamos los esporozoitos al ratón, éstos migran al hígado para establecerse y multiplicarse dentro de las células hepáticas (ver Figura 7). Para determinar el desarrollo del parásito, monitorizamos a los animales las primeras 24-48 horas mediante un sistema de imagen *in vivo* –IVIS® Spectrum–, permitiendo ver y cuantificar la infección hepática por bioluminiscencia usando especies de *Plasmodium* modificadas genéticamente con el gen de la luciferasa. Los ratones son inyectados con una solución de luciferina (sustrato de la enzima de la luciferasa) que al reaccionar con el sustrato genera la bioluminiscencia captada por el IVIS® Lumina. A mayor bioluminiscencia, mayor carga de parásito en el hígado (ver Figura 8).

El parásito completa el ciclo dentro de las células hepáticas tras 48 horas, y es liberado al torrente sanguíneo donde se produce la invasión de los eritrocitos para completar la siguiente fase de su ciclo. En esta fase, podemos hacer el seguimiento del parásito dentro del eritrocito mediante marcaje de ADN, usando citometría de flujo para calcular el porcentaje de parasitemia. También usamos la técnica de PCR cuantitativa para calcular la cantidad de parásito presente en la sangre periférica. Esta técnica está especialmente indicada cuando la cantidad de parásito presente en sangre es muy baja, fuera del rango de detección ofrecido por la citometría de flujo

(<0,01%). Se considera que el tratamiento ha tenido éxito si no se observa parásito en sangre periférica después de 14 días de la infección con los esporozoitos.

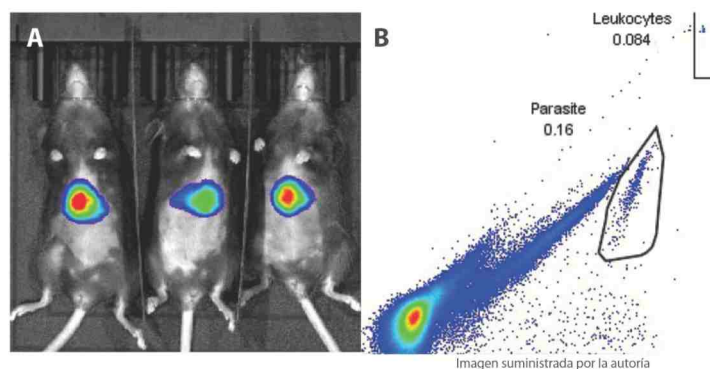


Figura 8.- A. Imagen obtenida en el IVIS en el que se muestra infección en estadio hepático. **B.** Parásito en eritrocitos de ratón marcados con el colorante de DNA Syto-16.

CONCLUSIONES

En este artículo hemos querido mostrar una pincelada de los ensayos realizados de manera rutinaria; pero junto a lo descrito aquí, realizamos otros ensayos que involucran una gran variedad de técnicas y diferentes cepas del parásito de malaria. Como mencionábamos al comienzo de este artículo, nuestro objetivo es trabajar para contribuir en la medida de lo posible a la erradicación de la malaria; para lo cual, el contar en nuestras instalaciones con un animalario e instalaciones de nivel de bioseguridad 3, nos permite poder evaluar una cantidad considerable de compuestos frente a esta enfermedad. Sin embargo, la complejidad del ciclo del parásito y el alto número de factores involucrados en su desarrollo hace que tengamos que trabajar con protocolos complejos que se extienden en el tiempo (entre uno y dos meses dependiendo de la especie de parásito), lo que dificulta la obtención de resultados a corto plazo. Pese a esto, todos nos esforzamos en trabajar día a día para poder contribuir a la erradicación de una enfermedad que causa casi 500.000 muertes al año como es la malaria (Informe de la Organización Mundial de la Salud 2020).

BIBLIOGRAFÍA

1. Smith T.A., Chitnis N., Briët O.J., et al. Uses of mosquito-stage transmission-blocking vaccines against *Plasmodium falciparum*. Trends in parasitology. 2011;27(5):190-6.
2. In Vivo Science & Delivery, Diseases of the Developing World. *El mosquito como animal de laboratorio*. Animales de laboratorio. 2020;84:24-6.
3. Singh P., Lingala M.A.L., Sarkar S., et al. Mapping of malaria vectors at district level in India: Changing scenario and identified gaps. Vector-borne and zoonotic diseases. 2017;17(2):91-8.

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 6Log en todas las superficies de la cámara y de la carga.



SAS Ventilado

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



Bioquell ProteQ

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



Bioquell BQ50

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



Bioquell L-4

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



Bioquell IG-2

Solución integrada con su equipo y proceso operativo.



Bioquell SeQure

Sistema fijo montado en pared.



Asilador Qube

Espacio de trabajo aséptico y personalizable con GPHV integrado.



MMM Group

bmt@bmtiberia.es
www.bmtiberia.es



Impacto de la microbiota intestinal en los modelos experimentales murinos

Josep Maria Marimon Escudé

Unitat d'Experimentació Animal, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona

Palabras clave: microbiota, reproducibilidad, comensales.

Desde hace unos años, han ido apareciendo evidencias científicas que indican un impacto importante de la microbiota intestinal en determinados estados tanto fisiológicos como patológicos de los individuos. En el caso del ratón como modelo animal, el impacto de la microbiota intestinal ha puesto de manifiesto sus posibles efectos en la extrapolación de estos modelos y su relación con lo que se ha venido a llamar la “crisis de reproducibilidad”.

Mantener un equilibrio de la microbiota intestinal es fundamental para preservar un estado saludable del organismo y tener un sistema inmune maduro y sano, por eso la importancia de los prebióticos y probióticos para revertir las disbiosis intestinales. Algunos estudios han evidenciado que aquellos animales que presentan un desequilibrio intestinal producido, por ejemplo, por el uso sostenido de antibióticos, o aquellos animales con carencias de una cierta cantidad de microbiota intestinal comensal, como ocurre en los animales gnotobióticos o axénicos, son más susceptibles a padecer enfermedades.

Se ha observado que los ratones axénicos presentan un sistema inmunitario más inmaduro e incompleto que sus congéneres SPF o aún más evidentemente, que sus congéneres silvestres. Además, los animales gnotobióticos también presentan mayores necesidades energéticas a nivel basal y tienen alterado el funcionamiento intestinal (menor tasa de renovación de los enterocitos, capa de moco protector más delgada y menor vascularización y peristaltismo).

Recientes estudios en ratón han demostrado que la microbiota intestinal no es un elemento pasivo sino que tiene efectos a nivel sistémico en muchas funciones del hospedador, como son los ritmos circadianos, el metabolismo o el entrenamiento y desarrollo de los componentes mayoritarios del sistema inmune tanto innato como adaptativo. Se ha visto también que la microbiota intestinal está alterada en multitud de trastornos que van desde problemas intestinales graves como la enfermedad inflamatoria intestinal,

hasta patologías neurológicas como la enfermedad Alzheimer o la enfermedad de Parkinson, actuando a través del eje cerebro-intestino.

Este eje conecta el sistema nervioso central con la microbiota intestinal a través de diferentes mediadores, como el sistema nervioso (con la intervención del sistema simpático y parasimpático y la actuación de las catecolaminas y el nervio vago, respectivamente), los metabolitos bacterianos que pueden actuar sobre la señalización nerviosa o sobre las células del sistema inmune (como por ejemplo los indoles) y el sistema neuroendocrino asociado al tracto digestivo. Relacionado con este eje se ha observado, por ejemplo, que algunas especies de *Lactobacillus* presentan un efecto ansiolítico e incluso se ha evidenciado la presencia de una determinada cepa de *Escherichia coli* que parece afectar al comportamiento maternal de las hembras de ratón, posiblemente en este caso alterando la producción de serotonina. A parte de estos efectos a nivel neurológico, también se han observado alteraciones de la microbiota intestinal en diabetes, obesidad, alergias o algunos tipos de cáncer.

Unos elementos importantes de la flora comensal del ratón son las bacterias filamentosas segmentadas (SFB, del inglés *segmented filamentous bacteria*), que han demostrado ser unas importantes inductoras de la inmunidad de la mucosa intestinal y de su resistencia frente a patógenos, como por ejemplo, *Helicobacter hepaticus*. Del mismo modo, la mayor o menor abundancia de la familia *Enterobacteriaceae* está asociada con la mayor o menor resistencia de la mucosa intestinal a ser colonizada por *Salmonella*.

Hay muchos factores que influyen en la microbiota intestinal de los ratones de laboratorio, estos pueden ser: el tipo de sistema de estabulación (convencional o barrera), el tipo de caja usada (abierta, filtro o ventilado), el lecho utilizado, el tipo de tratamiento que se aplica al agua de bebida, el transporte, la densidad de estabulación y los compañeros de estabulación (debido a la coprofagia), el sexo de los animales, el fondo genético, e incluso el proveedor (y dentro del

CONTROL SANITARIO

mismo proveedor, la instalación de origen) así como evidentemente el uso de antibióticos u otros fármacos que puedan alterar la composición y diversidad de la microbiota. Así mismo, estudios en ratones axénicos han demostrado que la ausencia de microbiota comensal se asocia con profundos problemas y defectos en la arquitectura y función del tejido linfoide intestinal.

Existen diferencias clave entre el sistema digestivo de los ratones y el sistema digestivo humano, como por ejemplo, el colon, que en humanos es relativamente más corto en proporción al resto del intestino que en el caso del ratón; o el ciego, que en ratón es relativamente largo y es un lugar importante para la fermentación de los productos de origen vegetal consumidos, así como para la producción de vitaminas K y B, y en cambio en humanos el ciego es relativamente pequeño, similar al colon a nivel estructural y sin una función clara. Aunque a nivel de microbiota intestinal tanto en humanos como en ratones predominan dos grandes filos, *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, cuando comparamos la totalidad de la microbiota intestinal de ratones y humanos encontramos que las especies predominantes son muy distintas y que el núcleo principal de microbiota (en número de especies) es más reducido en ratón que en humano. Estudios recientes han identificado alrededor de 80 géneros compartidos entre ratones y humanos, mientras que otras especies de animales de laboratorio, como ratas y cobayos, presentan poblaciones de microbiota más parecidas a las humanas. La microbiota intestinal de los ratones también presenta respuestas diferentes a los humanos frente a determinadas alteraciones como pueden ser los cambios inducidos por problemas inflamatorios intestinales, o los efectos derivados de una dieta rica en grasas, que aunque similares en ambas especies presentan una aparición mucho más rápida en el caso del ratón. Recientes estudios han revelado que la diversidad de la microbiota cecal de los ratones silvestres es mucho mayor que la de sus congéneres de laboratorio mantenidos en condiciones libres de patógenos específicos (SPF, del inglés *specific pathogen free*), además de ser más resistentes a las enfermedades, estos ratones con microbiota silvestre, presentan una respuesta, por ejemplo, a las inmunoterapias más parecida a la humana.

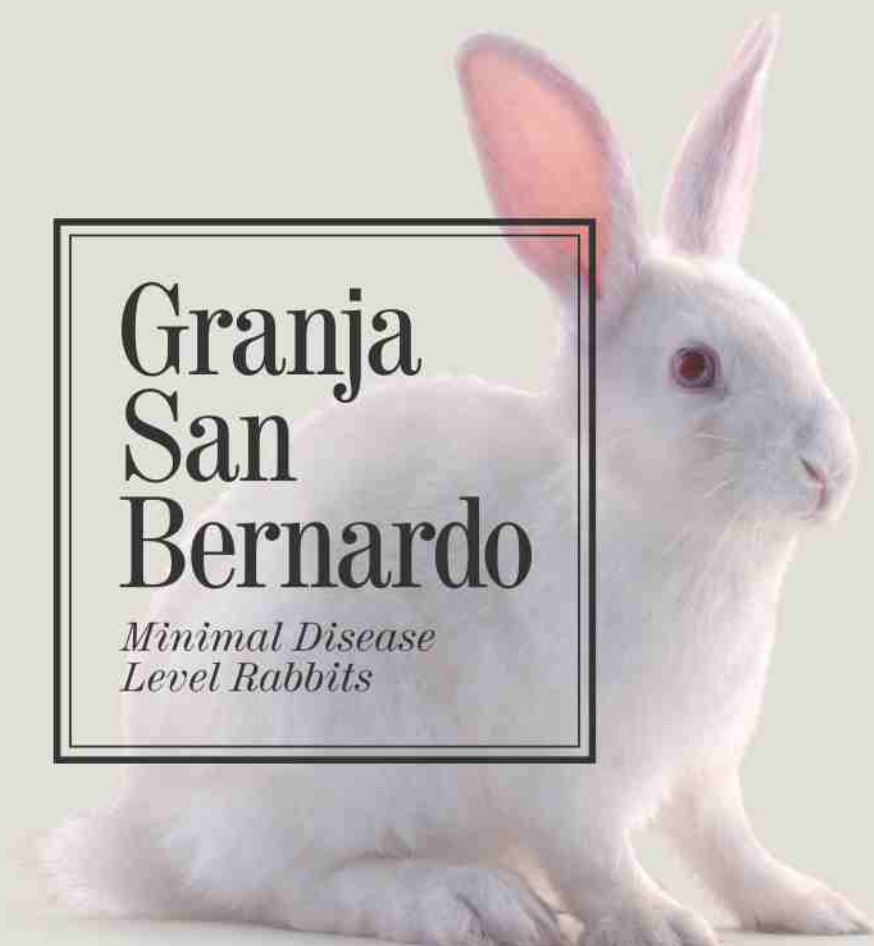
Como apuntábamos al principio, en el caso del ratón así como en otras especies de animales de laboratorio, el efecto de la microbiota intestinal tiene además un impacto en los resultados experimentales obtenidos y por ende puede afectar a la reproducibilidad y a la extrapolación de estos modelos animales. Por tanto, es esencial conocer en profundidad las poblaciones de los distintos organismos que componen la microbiota de las especies utilizadas en experimentación animal, su riqueza, su biodiversidad y sus interacciones, así como los posibles efectos en las distintas funciones fisiológicas y patológicas de dichas poblaciones. En este sentido,

varias líneas de investigación sugieren que la microbiota intestinal del ratón debería ser manipulada (estandarizada) para aumentar la extrapolación de las investigaciones realizadas en estos modelos murinos a los humanos. Incluso proponen el uso de madres subrogadas con una microbiota definida, para generar animales que vayan a ser usados en procedimientos experimentales, donde se ha observado un efecto importante de la microbiota sobre los resultados.

Por este motivo, los informes sanitarios podrían o deberían incluir, además de los patógenos y oportunistas habituales, determinadas especies de organismos comensales que se han visto de importancia, tanto en la resistencia del animal frente a determinados patógenos, como en la respuesta a determinadas condiciones experimentales, en este último caso al menos, para poder añadir los resultados microbiológicos a dichos experimentos.

BIBLIOGRAFÍA

- Benakis C., Brea D., Caballero S., et al. *Commensal microbiota affects ischemic stroke outcome by regulating $\gamma\delta$ T cells*. Nat Med. 2016;22(5):516-23.
- Correa-Fiz F, Blanco-Fuertes M., Navas M.J., et al. *Comparative analysis of the fecal microbiota from different species of domesticated and wild suids*. Scie Rep. 2019;9:13616.
- Ericsson A.C. and Franklin C.L. *The gut microbiome of laboratory mice: considerations and best practices for translational research*. Mamm Genome. 2021;https://doi.org/10.1007/s00335-021-09863-7.
- Lee Y.M., Mu A., Wallace M., et al. *Microbiota control of maternal behavior regulates early postnatal growth of offspring*. Science Advances. 2021;7(5): eabe6563.
- Nguyen T.L., Vieira-Silva S., Liston A., et al. *How informative is the mouse for human gut microbiome research*. Dis Model Mech. 2015;8(1):1-16.
- Petersen C., Bell R., Klag K.A., et al. *T-cell mediated regulation of the microbiota protects against obesity*. Science Jul. 2019;365(6451):eaat9351.
- Reandon S. *A mouse's house may ruin experiments. Environmental factors lie behind many irreproducible rodent experiments*. Nature. 2016;530:264.
- Singh V., Sadler R., Heindl S., et al. *The gut microbiome primes a cerebroprotective immune response after stroke*. J Cereb Blood Flow Metab. 2018;38(8):1293-8.
- Soto M., Herzog C., Pacheco J.A., et al. *Gut microbiota modulate neurobehavior through change in brain insulin sensitivity and metabolism*. Mol Psychiatry. 2018;23:2287-311.
- Zheng D., Liwinski T., and Elinav E. *Interaction between microbiota and immunity in health and disease*. Cell Res. 2020;30:492-506.



Granja San Bernardo

*Minimal Disease
Level Rabbits*

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

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



¿Te gusta la fotografía?

¿Haces fotos en el animalario
o te apetecería hacerlas,
pero no encuentras el momento
ni la justificación?

¿Te gustaría ver alguna
de tus fotos en la portada
de nuestra revista?



ENVÍANOS TUS FOTOS A:

direccion.revista@secal.es



Estos son los requisitos que necesitan las imágenes
para convertirse en FOTOS DE PORTADA:

Formato JPG

Alta resolución: (mínimo) 300 ppp

Orientación en vertical: 21,4 cm x 28,4 cm



**¡Anímate y forma parte de la historia
de la revista de la SECAL!**



sociedad española
para las ciencias
del animal de laboratorio

Ratones inmunodeprimidos: el puente entre el laboratorio y los pacientes

Rosa Bonavia¹ y Marta Casado Pinna²

¹Charles River Laboratories Spain, Responsable Estabulario IDIBELL, Hospital Duran i Reynals

²Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV-CSIC)

Palabras clave: *nude*, cáncer, sistema inmunitario.

INTRODUCCIÓN

El cáncer se encuentra entre las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Se trata de una enfermedad genética que aparece cuando, debido a mutaciones en uno o más genes, se pierden los mecanismos de regulación del ciclo celular. Este hecho da lugar a un incremento de las células rápido, desordenado y alterado que, en la mayoría de las ocasiones, se traduce clínicamente en la aparición de uno o más tumores.

En el cáncer también son importantes los factores epigenéticos, que son aquellos capaces de influir en la expresión y evolución de un tumor sin modificar el ADN; entre ellos estarían las hormonas, la dieta, condiciones ambientales, hábitos, etc. Hoy se conoce que, para ganar la partida a los tumores, hay que conocer y controlar los factores epigenéticos. Las características genéticas y los factores epigenéticos que lo rodean están correlacionados, y determinarán cual será el comportamiento del tumor. Además, conocer este comportamiento permitirá establecer cuál será el mejor tratamiento para cada tumor.

El tratamiento del tumor empieza en el laboratorio con la búsqueda de productos que sean capaces de destruir a las células tumorales. Inicialmente, se buscaron compuestos utilizando como diana la capacidad de las células tumorales de dividirse rápidamente. Pero esta característica de las células tumorales la comparten las células normales, y daba lugar a que los tratamientos se acompañaran de efectos secundarios con consecuencias iguales o más graves que las relacionadas con los tumores. Además, se observó que parte de los compuestos que podían destruir las células tumorales en el laboratorio no producían la misma respuesta en los pacientes, y se podían acompañar de efectos secundarios y/o secuelas graves. Por lo tanto, no eran viables como tratamiento contra los tumores.

Con el tiempo, se fueron desarrollando diferentes modelos preclínicos en los laboratorios utilizando seres vivos, como por ejemplo gusanos como el *Caenorhabditis elegans* o insectos como *Drosophila melanogaster* (mosca del vinagre). En estos organismos los mecanismos celulares son muy similares o iguales a los de las células humanas, por lo que era posible reproducir mutaciones observadas en los tumores. Así, si se observaba que un compuesto afectaba la mutación de un gen que podía inducir un tumor en estos organismos, había muchas probabilidades de obtener el mismo resultado en las personas.

Estos modelos ayudaban a conocer cada vez más y mejor la biología de los tumores, pero la biología de estos organismos es sencilla y con ellos no era posible evaluar cómo se comunican e interaccionan las células tumorales para eludir las defensas de un ser humano, cómo reaccionan los órganos y sistemas del cuerpo humano ante la aparición de las células tumorales, y cuál es la reacción de ambos cuando interviene el compuesto utilizado como tratamiento. Las interacciones son múltiples y las combinaciones numerosas; por lo tanto, era necesario encontrar un modelo animal para poder realizar estudios preclínicos *in vivo* con el que poder evaluar estas interacciones y, posteriormente, poder trasladarlo a los pacientes con cáncer.

El punto crítico que supuso un antes y un después en la investigación oncológica se sitúa en el año 1966, en una colonia de ratones de un laboratorio de Escocia donde se observó una mutación espontánea en un ratón, caracterizada por poco o ningún pelo en el cuerpo; por ello se llamó a este ratón *nude* (desnudo; ver Figura 1). Dos años después se describió que, además de no tener pelo, estos ratones no tenían timo o este era muy rudimentario, por lo que no tenían linfocitos T funcionales. La falta de linfocitos T disminuía la inmunidad adquirida de estos ratones; y, por consiguiente, se les podía implantar células de

REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA

tumores humanos, que crecían y se reproducían, ya que el sistema inmunitario del ratón *nude* era incapaz de reconocerlas como extrañas y destruirlas.



Imagen suministrada por la autoría

Figura 1.- Ratón atímico o *nude*. Se caracteriza por no tener pelo o escaso, piel con pliegues y ausencia de pestañas.

El ratón *nude* fue el primer modelo *in vivo* que permitió saber cómo se comportaban las células tumorales en todas las fases del tumor (crecimiento, multiplicación, expansión y diseminación), y donde evaluar no sólo la efectividad de los compuestos que se sabía eran eficaces en el laboratorio, sino también cuales eran las interacciones entre las células tumorales, el compuesto y el organismo, y si se producían efectos secundarios o secuelas.

Desde entonces, a lo largo de los años se han ido describiendo más cepas de ratones con mutaciones, espontáneas e inducidas, que afectan a su sistema inmunitario y que se utilizan como modelos *in vivo* en las investigaciones oncológicas (ver Figura 2). Hoy en día, se pueden encontrar desde diferentes cepas de ratones *nude* a cepas con mutaciones que afectan a la inmunidad innata, adquirida o combinaciones de ambas, que han permitido el desarrollo de los ratones con PDX (*patient-derived xenograft*, ratones que incorporan el tumor de un paciente y se utilizan para medicina personalizada) hasta cepas de ratones humanizados que contienen un sistema inmunitario humano funcional y, en los que, al implantar un tumor, permiten estudiar *in vivo* la inmunología e inmunoterapia de los tumores.

1966: se describe la mutación *nude*.

1980: se describe los ratones SCID (*severe combined immunodeficiency*).

1992: se describe la mutación *Rag1* en ratones, obtenida por transgénesis dirigida.

1993: se describe el ratón SCID *beige*.

1995: la mutación SCID se transfiere a un fondo genético NOD, y se describe la mutación *Il2rg* obtenida por transgénesis dirigida. En estas cepas se podían implantar células sanguíneas y células madre sanguíneas. Se ha iniciado la búsqueda de modelos de ratón inmunodeprimidos que puedan humanizarse.

1997-2003: se describen diferentes cepas de ratones cada vez más inmunodeprimidos, lo que facilita que acepten células y tejidos humanos.

2005: se describe el ratón NSG (NOD SCID GAMMA), prácticamente sin sistema inmunitario, con lo que es posible humanizarlo para la investigación del sistema inmunitario, infecciones, oncología y células madre.

2005 hasta hoy: aparición de diferentes modelos de ratones humanizados como resultado del desarrollo de diferentes cepas y variedades de ratones muy inmunodeprimidos. Ejemplo: en 2015 se describe el ratón NBSGW, similar al NSG, en el que se pueden implantar células hematopoyéticas humanas sin necesidad de irradiación previa.

Figura 2.- Cronología de la aparición de diferentes modelos de ratones inmunodeprimidos.

Cada una de estas cepas de ratones se ha convertido en un punto de encuentro entre el laboratorio y los pacientes y, hoy en día, pone a disposición de la investigación oncológica un entramado de vías y opciones de valor incalculable para la realización de ensayos preclínicos de los tratamientos contra los tumores (ver Figura 3).



Imagen suministrada por la autoría

Figura 3.- Distintos modelos de ratones inmunodeprimidos no *nude*: **A.** NSG (blancos). **B.** SCID *hairless*, que nacen con pelo y lo pierden entre los 15 y 21 días de vida. **C.** RAG1 (negros). **D.** NBSGW (grises con manchas blancas).

TIPO DE RATONES INMUNODEPRIMIDOS

Para entender mejor cómo son las diferentes cepas de ratones inmunodeprimidos, hay que recordar cómo está organizado el sistema inmunitario (ver Glosario 1). De manera muy resumida, la inmunidad se divide en:

- **Innata:** desde el nacimiento, reconoce a patógenos y actúa sin necesidad de contacto previo con antígenos. Se basa en células que no requieren ningún "entrenamiento" adicional para realizar su trabajo. Las respuestas innatas a las infecciones se producen de forma rápida y fiable. Incluye: granulocitos, macrófagos, células NK (*natural killer*) y sistema del complemento.
- **Adquirida:** se desarrolla a lo largo de la vida como respuesta a agentes externos. Las células requieren "entrenamiento" o educación para aprender a no atacar a nuestras propias células. Las ventajas de la inmunidad adquirida son su memoria de larga duración y la capacidad de adaptarse a nuevos gérmenes. Incluye: linfocitos T, linfocitos B, anticuerpos y células dendríticas.

Hoy en día, existen diferentes cepas de ratones inmunodeprimidos, con diferentes grados de inmunosupresión debido a que tienen una o más mutaciones en uno o más genes, que reducen o anulan una parte del funcionamiento de su sistema inmunitario. Hay una nomenclatura establecida que nombra y describe cada mutación; cuanto mayor número de mutaciones están incluidas en el nombre de una cepa de ratón, mayor grado de inmunodeficiencia presenta (ver Glosario 2).

También es posible encontrar una mutación en un gen que afecta a la inmunidad en diferentes fondos genéticos de ratones. Por ejemplo, la mutación *nude* en el gen *Foxn1* se puede encontrar en fondo genético Balb C, Swiss, CD1, NMRI...

Hay que añadir que, las cepas de ratones son algo diferentes según el proveedor. Esto se debe a que en cualquier momento se pueden producir cambios en el ADN, relacionados con su reparación o replicación. Se denomina deriva génica cuando estos cambios en el ADN pasan a las células germinales y se transmiten a las siguientes generaciones. Estos cambios en el ADN pueden ser desde pequeños e insignificantes a grandes e importantes, y se acumulan modificando el genoma. El ratón tiene una alta tasa de deriva génica, y se considera que después de 20 generaciones consecutivas criadas por separado, los ratones de un mismo origen ya son dos subcepas distintas. Por lo tanto, ratones

procedentes del mismo origen, pero criados por diferentes proveedores pueden presentar pequeñas diferencias. Por este motivo, al nombre del ratón se añade una letra que indica cual es el proveedor que lo suministra. En las Tablas 1-3 se describen algunos de los modelos de ratones comerciales más utilizados en nuestros animalarios.

CÓMO ENTENDER LAS CEPAS DE RATONES INMUNODEPRIMIDOS

Con el grado de especialización existente en la investigación oncológica, la variabilidad que presentan los tumores, y la amplia gama de cepas inmunodeprimidas disponibles no siempre es fácil escoger un modelo de ratón inmunodeprimido. Cada modelo tiene ventajas e inconvenientes y se necesita el que aporte más ventajas, e incluso puede ser necesario utilizar más de un modelo.

No hay una pauta, regla o protocolo que señale claramente el modelo a escoger. Pero sí se pueden dar una serie de premisas o pasos a seguir que ayuden a seleccionar el modelo que mejor se adapte a la línea de investigación, y nos ayuden a encontrar la respuesta a estas dos preguntas:

- ¿Cómo podemos identificar y seleccionar cuál es la cepa más adecuada para nuestra investigación?
- Y una vez seleccionada, ¿a qué proveedor le pido que me la suministre?

SELECCIÓN DEL MODELO DE RATÓN INMUNODEPRIMIDO

El punto de partida para seleccionar un modelo de ratón inmunodeprimido se sitúa en la línea de investigación en la que trabajamos y, posteriormente, es cuando miremos las posibles opciones en los catálogos de los proveedores. Lo primero que tenemos que hacer es sentarnos y enumerar cuál o cuáles son las dianas a las que se dirige la investigación: ¿compuestos para tratamientos de tumores?, ¿establecer modelos PDX?, ¿estudio del sistema inmunitario, y de que parte?, ¿quimioresistencia?, ¿metástasis?, ¿angiogénesis?, ¿inmunoterapia?, ¿viroterapia?, ¿mecanismos celulares?, ¿estudiar una o más partes del sistema inmunitario y saber qué ocurre cuando una o más de estas partes se anulan?, ¿cómo incrementar la fuerza del sistema inmunitario frente a las células tumorales?...

Es importante hacer consultas y búsquedas exhaustivas por si hay estudios similares que puedan servir de referencia sobre qué cepas han utilizado y por qué. Existen muchas fuentes de información: internet, webs especializadas, publicaciones en

REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA

formato electrónico, listas de distribución, contactos con otros grupos de investigación... , pero hay una que es muy útil y que no siempre se tiene en mente y son los servicios técnicos de los proveedores, que disponen de la información técnica de sus cepas en forma de fichas técnicas, posters, comparativas entre cepas, recomendaciones, métodos de evaluación para la selección, referencias bibliográficas, artículos...

Una vez tengamos ya toda esta información podemos empezar a seleccionar el modelo haciéndonos la primera de las preguntas: ¿los ratones han de ser consanguíneos (*inbred*) o no consanguíneos (*outbred*)? Los *inbred* son genéticamente homogéneos y el tumor crecerá en ellos de la misma manera. Los *outbred* son genéticamente más heterogéneos, por lo que los tumores pueden crecer de manera diferente en cada ratón, pero reflejan mejor la variabilidad, son más fuertes y por tanto más adecuados para experimentos de larga duración, ya que su vida media es más larga que otras cepas. Y a pesar de estas diferencias, en ocasiones, hay ratones que son externamente indistinguibles (ver Figura 4).

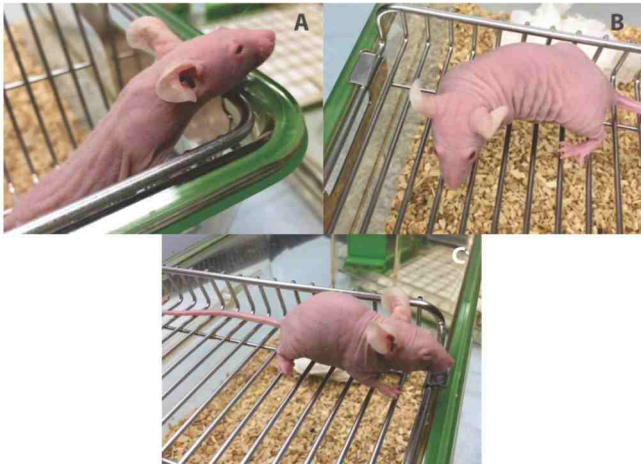


Imagen suministrada por la autoría

Figura 4.- Diferentes modelos de ratones inmunodeprimidos. Aunque externamente parezcan iguales en la imagen se presentan tres modelos diferentes. **A.** Atímico. **B.** Balb C *nude*. **C.** SCID *hairless*.

Lo siguiente que hemos de preguntarnos es: ¿qué tipo de inmunodeficiencia necesito? y, por lo tanto, ¿qué cepa de ratón inmunodeprimido selecciono para mi procedimiento?

Para facilitar cómo escoger podemos dividir los ratones inmunodeprimidos en los siguientes grupos.

Ratones *nude*

Son los ratones más resistentes y se suelen utilizar, generalmente, para evaluación de tratamientos y para experimentos largos (ver Figura 5). La falta de linfocitos T hace que sean más sensibles a las infecciones bacterianas y la manipulación debe hacerse manteniendo al máximo las condiciones de esterilidad. La falta de pelo facilita la implantación y el control del crecimiento de los tumores, por lo que han sido y aún siguen siendo utilizados para evaluación de tratamientos. Existe la posibilidad de que con la edad recuperen parcialmente la inmunidad (*leakiness*), pues se ha observado que entre las 12 y las 24 semanas presentan incrementos de inmunoglobulinas G. Los linfocitos B son normales, lo que puede limitar el crecimiento de líneas celulares tumorales, y limita el tipo de tumores que se les pueden implantar. Los podemos encontrar en diferentes fondos genéticos (Balb C, CD1, Swiss, NMRI), y criados como *inbred* y *outbred*.

- Ausencia de pelo o algunos pelos aislados.
- Carecen de pestañas y los bigotes son menores que en otras cepas.
- La piel puede ser fina y lisa o engrosada y con pliegues.
- Cría en heterocigosis (macho *nude* por hembra heterocigota).
- Las hembras *nude* son fértiles, pero no se les desarrollan las mamas para la lactación.
- Sensibles a infecciones bacterianas y a desarrollar abscesos.
- Los machos tienden a ser agresivos, según el fondo genético, y con la edad.
- Criados como *outbred* son más resistentes que los *inbred*.
- Las infecciones microbianas pueden activar la funcionalidad de las células T con la edad.
- La falta de pelo facilita el control de los tumores implantados subcutáneamente.
- Vida media de 1 año.
- Tienen inmunidad innata y células B, no es la cepa más adecuada para establecer modelos tumorales.

Figura 5.- Principales características de los ratones *nude*.

Ratones SCID

Presentan una mutación en el gen *Pkrdc* que afecta tanto a la recombinación de fragmentos de inmunoglobulinas para formar anticuerpos como a los receptores de linfocitos T; por lo tanto, no disponen de linfocitos T y B maduros y no tienen inmunidad adaptativa (ver Figura 6). Esta mutación puede encontrarse en ratones normales con pelo y en ratones *hairless* y el fondo genético originario sería tipo Balb C. Con la edad existe la probabilidad de que recuperen parcialmente la inmunidad, denominada SCID *leakiness* (perdida de la inmunodeficiencia SCID). Los SCID *hairless* se crearon para aunar las ventajas de los SCID, en los que pueden crecer más tipos diferentes de tumores, con la de los atímicos, en los que la falta de pelo facilita la implantación y el control del crecimiento de los tumores. El principal inconveniente de los SCID es su corta vida y que desarrollan timomas con facilidad.

Ratones SCID en combinación con otras mutaciones

Suelen tener asociadas otras mutaciones que incrementan su inmunodeficiencia. Así, cuando se añade *Beige* significa que tienen una mutación en el gen *Lyst* (ausencia de células NK); cuando se presentan en el fondo genético NOD también presentan defectos en la inmunidad innata, como menor actividad de las células NK, macrófagos y células dendríticas y falta del sistema de complemento, pero la mitad desarrollan diabetes. Aunque si los NOD tienen añadido la ausencia del gen *Rag1*, los ratones no desarrollan diabetes.

Ratones Rag 1 o Rag 2

Esta deficiencia significa que en estos ratones no se producen las reorganizaciones en las superficies de los linfocitos T y B que generan los receptores de antígenos; sus células B y T no son maduras ni funcionales. Se puede decir que son unos ratones SCID, pero sin posibilidad de recuperar la inmunidad. Estos ratones tienen un fondo genético B6, y a diferencia del resto, son de color negro. Se utilizan para estudios sobre linfocitos.

- Aspecto externo igual a un ratón swiss o CD1.
- Vida reproductiva corta, camadas no muy numerosas (5-6 crías).
- Aparición más o menos marcada del fenotipo *leakiness* según el fondo genético, edad y modo de estabulación.
- Elevada incidencia de timomas según el fondo genético.
- Cuando son NOD pueden presentar diabetes un pequeño porcentaje de los ratones.

- Hay una variante sin pelo, los SCID *hairless*: crían con facilidad, las camadas suelen ser numerosas, las crías nacen con pelo y lo pierden entre los 15-21 días de edad. Los progenitores pueden presentar inflamaciones de conjuntiva y parpados por la presencia en la cubeta del pelo perdido por las crías. A diferencia de otros SCID, la falta de pelo facilita el control de los tumores implantados subcutáneamente y permite obtener mejores imágenes.
- Vida media de 5-9 meses (*hairless* casi un año).
- Carecen de células B, por lo que aceptan mejor los tumores implantados que los ratones atímicos.

Figura 6.- Principales características de los ratones SCID.

Ratones N-G

Estas cepas de ratones inmunodeprimidos son las que han permitido el desarrollo de los modelos de ratones humanizados. En la Figura 7 se describen sus características. La letra central del nombre puede variar en función del proveedor del ratón. Su sistema inmunitario es prácticamente inexistente, por lo que no interfiere con los tejidos o tumores humanos. Esta característica es su principal ventaja, y a la vez es su mayor inconveniente, ya que la casi ausencia de sistema inmunitario les hace muy susceptibles a las infecciones por bacterias, incluyendo las de su propia flora saprofita cutánea o intestinal.

- Aspecto externo idéntico a un Swiss o CD1.
- Color albino.
- Carecen de sistema inmunitario, son muy sensibles a microorganismos.
- Mantenimiento en rack ventilado.
- Buenos reproductores.
- Vida media 1 año.
- Existen variedades *hairless*, en los que la ausencia de pelo permite observar mejor el crecimiento de los tumores subcutáneos y permite obtener mejores imágenes.
- Hay disponibles variedades con diferentes características, en diferentes proveedores, como por ejemplo no necesitar irradiación previa.
- Permiten realizar experimentos largos.

Figura 7.- Principales características de los ratones N-G.

REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA

Cuando se habla de ratones humanizados se refiere a ratones que no tienen sistema inmunitario y en los que se pueden implantar células del sistema inmunitario humano, las cuales originan una "copia" del sistema inmunitario de un ser humano. Al implantarle un tumor, el tumor también crece, se expande e interacciona con el sistema inmunitario implantado en el ratón como lo haría en un ser humano. Un ratón humanizado se convierte en un modelo que mimetiza parte de la fisiología de un ser humano, que es posible obtener un grupo de ratones iguales y que en ellos se puede estudiar interacción entre el sistema inmunitario y el tumor. Los resultados obtenidos en estos ratones humanizados se pueden extrapolar a los seres humanos, ya que han compartido el mismo sistema inmunitario y el tumor. Los ratones humanizados se han convertido en una herramienta muy valiosa para la realización de ensayos preclínicos en estudios de oncología e inmunoterapia.

El primer ratón que fue posible humanizar fue la cepa NSG, desarrollada por The Jackson Laboratories. Posteriormente, se fueron desarrollando variantes de esta cepa, como los NRG, NSGS, NBSGW, en los que se pueden injertar células hematopoyéticas sin necesidad de irradiación previa y cuya vida media es más larga que en otros subtipos de NSG.

¿Y CUANDO HE SELECCIONADO MÁS DE UNA CEPAS?

En ocasiones, se pueden encontrar referencias en la bibliografía de diferentes autores que han utilizado cepas similares con buenos resultados. Si no hay referencias sobre la línea de investigación a realizar, es probable que surjan dudas con cepas similares de diferentes proveedores o de un mismo proveedor. O que el estudio que nos planteamos aún no está descrito; o se hizo con cepas de ratones sin resultados positivos, pero ahora hay más cepas de inmunodeprimidos disponibles con las que se podrían obtener resultados.

¿Cómo resolver estas situaciones? Realizando una prueba piloto para comparar cuál de las cepas es la más adecuada para la investigación. Esta posibilidad se puede tener incluida en el proyecto autorizado si incluye la utilización de cepas inmunodeprimidas de manera genérica, como sucede con los proyectos que trabajan con tumores primarios procedentes de pacientes. En estos proyectos puede ser necesaria una cepa para crecer el tumor y establecer el modelo y otra para los tratamientos. También puede ser que en el proyecto se describan varias cepas a

utilizar según el tipo de tumor o procedimiento, pero que durante su vigencia se deban incluir nuevas cepas. Si la prueba piloto no está incluida, siempre se puede solicitar al CEEA la autorización para realizarla.

El tiempo dedicado a una prueba piloto siempre es de utilidad. Las pruebas piloto permiten resolver las dudas, optimizar los recursos y el tiempo de realización del proyecto, y son las que posibilitan el ver con más claridad la idoneidad de la cepa inmunodeprimida seleccionada. Por lo tanto, aunque para un mismo tipo de procedimiento sea posible utilizar varias cepas, siempre es posible encontrar una que sea la que más se ajuste a la línea de investigación.

CONCLUSIONES

El cáncer se encuentra entre las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Aunque el tratamiento del tumor empieza en el laboratorio con la búsqueda de productos que sean capaces de destruirlo, se necesitan modelos *in vivo* que permitan evaluar las interacciones organismo-tumor-tratamiento; dentro de tratamiento se incluyen, no sólo, los compuestos capaces de destruir las células (sustancias, fármacos, virus, etc.), sino todo aquello que impida al tumor crecer y expandirse (inmunoterapia, fármacos antiangiogénicos, evitar que consiga energía y alimento, etc.). Cuanto más similares sean estos modelos a los seres vivos, mejor se podrán extrapolar los resultados obtenidos a los pacientes con cáncer.

Las cepas de ratones inmunodeprimidos son los mayores aliados que tenemos en la búsqueda de tratamientos contra los tumores; tienen un valor incalculable y son el puente que permite comunicar la investigación y el paciente.

Aunque, aparentemente, la cantidad y variedad de los tipos de ratones inmunodeprimidos disponibles en la actualidad parezca un entramado complejo de ver y entender, deja de serlo cuando se tiene presente el esquema básico del sistema inmunitario, a qué parte o partes de este sistema afectan las mutaciones de los ratones inmunodeprimidos y cuál es la diana de la investigación en la que trabajamos. Definir estos tres conceptos para usar un árbol de decisión (ver Figura 8), nos ayudara a encontrar cual de todas las cepas de ratones inmunodeprimidos es la que nos será más útil e incorporarla a nuestra investigación.

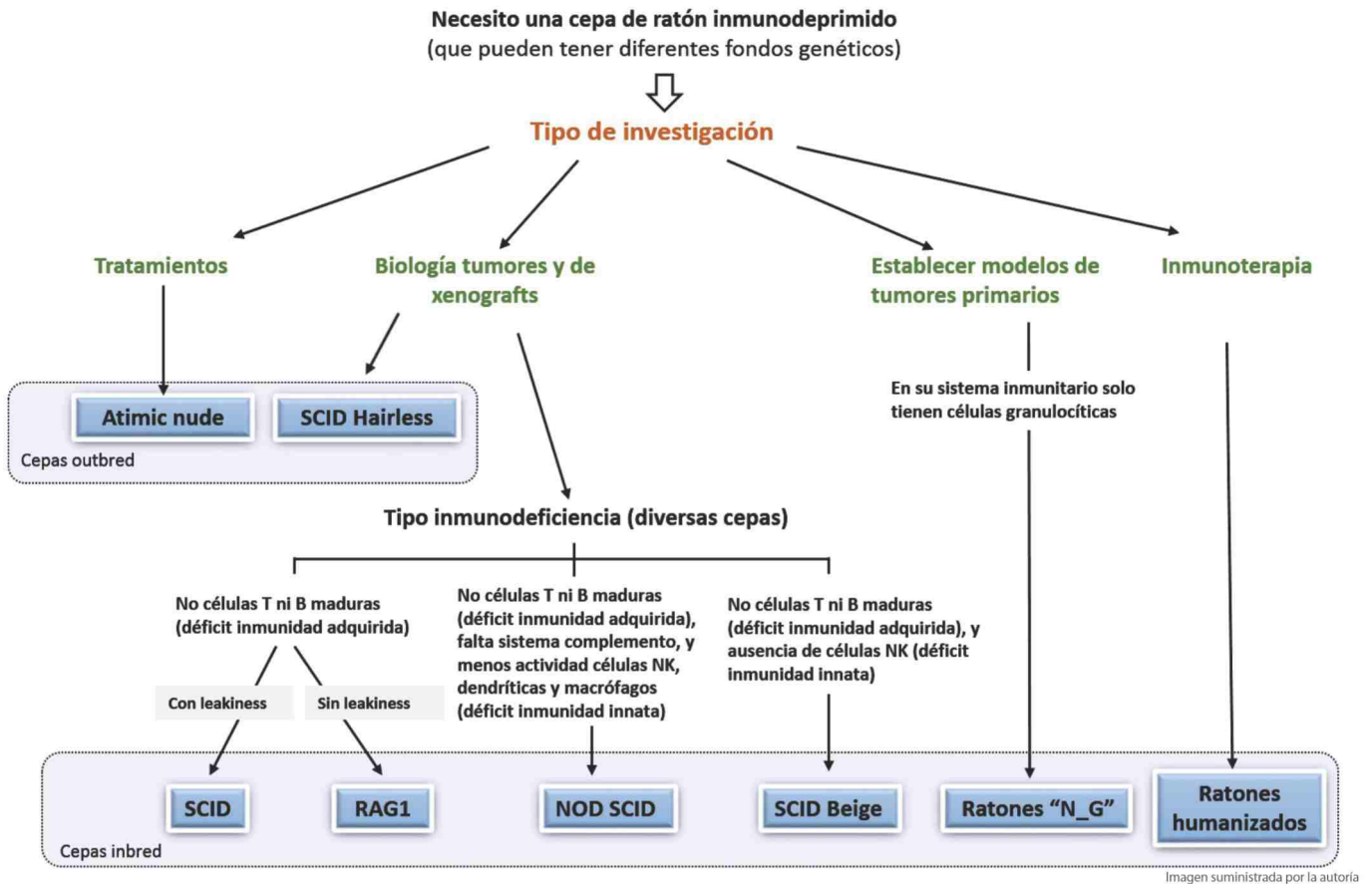


Figura 8.- El árbol de decisión. Orientación para tomar un camino a la hora de escoger qué ratón inmunodeprimido se ajusta más a mi proyecto experimental.

GLOSARIO

Glosario 1: Células del Sistema Inmunitario

- **Células B:** a veces denominadas linfocitos B y a menudo nombradas en los informes de laboratorio como células CD19 o CD20. Su función principal es producir anticuerpos (también llamados inmunoglobulinas o gammaglobulinas). Los linfocitos B se desarrollan en la médula ósea a partir de células madre hematopoyéticas.
- **Células T:** la "T" significa timo; a veces denominadas linfocitos T y a menudo nombradas en los informes de laboratorio como células CD3. Se desarrollan a partir de células madre hematopoyéticas en la médula ósea, pero completan su desarrollo en el timo. Dentro del timo, los linfocitos inmaduros se convierten en células T maduras y se eliminan las células T con potencial para atacar los tejidos normales. Las células T maduras salen del timo y pueblan otros órganos del sistema

inmunitario, como el bazo, los ganglios linfáticos, la médula ósea y la sangre. Las células T tienen diferentes capacidades para reconocer el antígeno y son variadas en su función:

- **Células T "asesinas" o citotóxicas:** a menudo denominadas células T CD8 en los informes de laboratorio. Protegen al organismo de ciertas bacterias y virus, y se encargan de la destrucción real de las células infectadas.
- **Células T auxiliares:** ayudan a las células B a producir anticuerpos y asisten a las células T asesinas en su ataque a las sustancias extrañas.
- **Células T reguladoras:** suprimen o desactivan otros linfocitos T. Sin las células T reguladoras, existe la posibilidad de que el organismo "reaccione de forma exagerada" ante la infección. Las células T reguladoras actúan como el termostato del sistema de linfocitos para mantenerlo encendido "lo suficiente, ni demasiado, ni demasiado poco".

REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA

- **Células asesinas naturales (NK):** linfocitos efectores del sistema inmunitario innato que controlan varios tipos de tumores e infecciones microbianas limitando su propagación y el consiguiente daño tisular. Las células NK expresan receptores específicos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I. La intensidad y la calidad de las respuestas citotóxicas y de citoquinas de las células NK dependen del microentorno de citoquinas, así como de las interacciones con otras células del sistema inmunitario, como las células T, las células dendríticas y los macrófagos.

En el ratón, se han descrito tres subconjuntos de células NK que se diferencian en la expresión de CD11b y CD27 (CD11b^{duil}CD27⁺, CD11b⁺CD27^{duil}, y CD11b⁺CD27⁺), en la capacidad de secretar interferón y en su localización. Además, los receptores de quimiocinas CCR2, CCR5, CXCR3 y CX3CR1 regulan el reclutamiento de células NK en caso de inflamación, al igual que el receptor de la esfingosina 1-fosfato (S1P), S1P5.

- **Células dendríticas (CD):** responsables de la iniciación de las respuestas inmunitarias adaptativas y, por tanto, funcionan como los "centinelas" del sistema inmunitario. Están especializadas en captar y procesar antígenos, convirtiendo las proteínas en péptidos que se presentan en las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) reconocidas por las células T. Los precursores de las CD migran desde la médula ósea, a través del torrente sanguíneo, hasta casi todos los tejidos no linfoides, donde residen en un estado inmaduro (CDi). Durante la invasión de patógenos, las CDi residentes detectan a los intrusos a través de receptores de reconocimiento de patrones (por ejemplo, TLR), capturan antígenos y abandonan rápidamente el tejido. Durante su migración desde los tejidos periféricos, en respuesta a una serie de quimiocinas como CCL19 y CCL21, las CD experimentan una maduración fenotípica y funcional. Lo más destacable es que dejan de captar antígenos al tiempo que aumentan la expresión de moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86 y el receptor de quimiocinas CCR7, y secretan citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-12.

Las CD pueden subdividirse en dos subtipos principales: plasmocitoides (pDC) y mieloides (mDC), que se especializan en el reconocimiento de diferentes patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) debido a la distribución única de los Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRR), como los receptores tipo Toll, las lectinas tipo C y los sensores de ácidos nucleicos intracelulares.

- **Macrófagos:** células especializadas que participan en la detección, fagocitosis y destrucción de bacterias y otros organismos nocivos. Además, también pueden presentar antígenos a las células T e iniciar la inflamación liberando moléculas (conocidas como citoquinas) que activan otras células. Se originan a partir de monocitos sanguíneos que salen de la circulación para diferenciarse en diferentes tejidos. Existe una importante heterogeneidad entre cada población de macrófagos, que muy probablemente refleja el nivel de especialización requerido en el entorno de un tejido determinado. Esta heterogeneidad se refleja en su morfología, en el tipo de patógenos que pueden reconocer, así como en los niveles de citoquinas inflamatorias que producen (es decir, IL-1, IL-6, factor de necrosis tumoral alfa). Además, los macrófagos producen especies reactivas de oxígeno, como el óxido nítrico, que pueden eliminar las bacterias fagocitadas. La naturaleza heterogénea de estas células puede no ser únicamente el resultado de su proceso de diferenciación, sino que es probable que se herede de sus precursores monocitos.

Glosario 2: Genes relacionados con la inmunodepresión en ratones

- *Foxn1: forkhead box N1*

MGI: 102949

Ensembl: ENSMUSG00000002057

La proteína codificada por este gen forma parte de la familia de factores de transcripción FOX importantes en los procesos de desarrollo, la regulación del sistema inmunitario, el metabolismo, el cáncer, y el envejecimiento. Esta familia de genes tiene más de 100 miembros, subdivididos en clases (A-Q) basadas en la filogenia. Se ha propuesto que la proteína codificada regule el desarrollo del timo y la diferenciación de los queratinocitos. Las mutaciones en este gen causan inmunodeficiencia primaria grave de células T y alopecia congénita.

- *Rag1: recombination activating 1 y Rag2: recombination activating gene 2*

MGI: 97848 y 97849

Ensembl: ENSMUSG000000061311 y ENSMUSG000000032864

Las respuestas inmunitarias adaptativas requieren la expresión de receptores capaces de reconocer antígenos específicos. En los vertebrados con mandíbula, esta función se lleva a cabo mediante la recombinación V(D)J, en la que la unión de elementos codificantes variables (V), de diversidad (D) y de unión (J) de los genes de inmunoglobulina y TCR, da lugar a la generación de un repertorio diversificado de TCRs y BCRs específicos de antígeno. Las proteínas RAG1 y RAG2 inician el proceso de recombinación V(D)J. Dos moléculas de RAG1 y dos moléculas de RAG2 forman un heterotetrámero que se une a las secuencias señal de recombinación (RSS) que flanquean los genes V, D y J e introduce roturas de doble cadena en el ADN, que posteriormente son reparadas por la vía de reparación del ADN por unión de extremos no homólogos, uniendo los segmentos del gen para formar uniones codificantes y los RSS escindidos y las secuencias intermedias para formar uniones señal. El componente del gen activador de la recombinación 1 contiene la mayor parte de la actividad catalítica, mientras que el N-terminal del componente del gen activador de la recombinación 2 se cree que forma una hélice de seis palas en el núcleo activo que sirve como andamio de unión para la estrecha asociación del complejo con el ADN.

- *Il2rg: interleukin 2 receptor, gamma chain*

MGI: 96551

Ensembl: ENSMUSG00000031304

Este gen codifica una proteína transmembrana que es una subunidad común de varios complejos de receptores de interleucina. Estos receptores están compuestos por subunidades alfa y beta, además de esta subunidad gamma. La señalización a través de esta vía es importante para la diferenciación y la función de las células inmunitarias. IL-2R γ participa en la formación de receptores funcionales de citoquinas no sólo para IL-2 sino también para IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15.

- *Prkdc: protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide*

MGI: 104779

Ensembl: ENSMUSG00000022672

Este gen codifica la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente del ADN (DNA-PK). Funciona con la proteína del heterodímero Ku70/Ku80 y es requerida en el proceso de recombinación no homóloga durante la reparación del ADN, que religa los cortes existentes en las dobles hebras. También es requerida en el proceso de recombinación V(D)J, un proceso que utiliza la recombinación no homóloga para promover la diversidad del sistema inmune.

- *Lyst: lysosomal trafficking regulator*

MGI: 107448

Ensembl: ENSMUSG00000019726

Este gen codifica una proteína que regula el tráfico intracelular de proteínas en los endosomas, y puede estar implicado en la pigmentación. Las mutaciones en este gen están asociadas al síndrome de Chediak-Higashi, un trastorno de almacenamiento lisosómico.

Glosario 3: Mutaciones

- *SCID (Severe Combined Immune Deficiency)*: mutación autosómica recesiva recientemente mapeada en el cromosoma 16 que afecta al gen *Prkdc* y que provoca una inmunodeficiencia combinada grave.
- *Nude (nu)*: mutación autosómica recesiva que provoca una delección de un sólo par de bases (G) en el exón 3 del gen *Foxn1*, que introduce un cambio de marco y un codón de parada prematuro. Fenotípicamente los ratones parecen no tener pelo, aunque nacen con folículos funcionales, pero defectuosos. Los ciclos y patrones de crecimiento del pelo son evidentes, especialmente en los ratones pigmentados, pero los folículos defectuosos no permiten que el pelo brote correctamente.
- *Beige (bg) y Beige-J (bg^J)*: el nombre de esta mutación de ratón representa el color de los ratones afectados en la descripción original de la mutación *beige* (bg) en el gen *Lyst* que surgió en el Laboratorio Nacional de Oak Ridge, como una mutación inducida por la radiación. Estos ratones estaban en un fondo agutí (A/-) negro (B/-) y mostraban una disminución de la pigmentación de las orejas, la cola y el pelo dorsal, resultando la banda subterminal amarilla, la media gris oscura y la base

REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA

gris muy clara. Los ratones tenían una coloración café con leche o *beige*. Una remutación espontánea, el *beige-J* (bgJ), surgió en The Jackson Laboratory en la cepa endogámica C57BL/6J. Esta cepa es un ratón no agutí (a/a), negro (B/B). El resultado es un ratón afectado de color gris oscuro (carbón).

- purpose <https://www.criver.com/resources/webinar-pi-rm-oncology-research-right-model-right-purpose>
- Charles River resources www.criver.com
- How to select the right oncology model (ENVIGO) www.envigo.com/resources
- Choosing an immunodeficient model. The Jackson Laboratory <https://www.jax.org/news-and-insights/2006/march/choosing-an-immunodeficient-mouse-model>
- Top Tips on Selecting the "Best" Immunodeficient Mouse Model for Your Research <https://resources.jax.org/immuno-oncology-oncology/top-tips-on-selecting-the-best-immunodeficient-mouse-model-for-your-research>
- Belizário J.E. *Immunodeficient Mouse Models: An Overview*. The Open Immunology Journal. 2009;2:79-85.
- Tian H., Lyu Y., Yang Y.G., et al. *Humanized rodent models for cancer research*. *Frontiers in Oncology*. 2020;10:1696.

BIBLIOGRAFÍA

- Póster: Immunodeficient models for oncology studies (Charles River) <https://www.criver.com/user/login?destination=/resources/info-pi-rm-immunodeficient-mouse-models-charles-river-europe>.
- Póster: Immunodeficient models (Charles River) <https://www.criver.com/user/login?destination=/resources/info-pi-rm-immunodeficient-mouse-models-charles-river-na>.
- Webinar on demand: Oncology research the right model for the right

Tabla 1.- Características de algunos de los modelos de ratones inmunodeprimidos que podemos adquirir en Charles River^a.

Nombre Común	NSG	NRG	NOD SCID	NOD SCID	Fox Chase SCID® Beige	Fox Chase SCID	BALB/c Nude	BALB/c Nude	Athymic Nude	NMRI Nude
Nomenclatura completa	NOD.Cg-Prkdc ^{scid} IL2rg ^{tm1Wj} /SzJ	NOD.Cg-Rag1 ^{tm1Mom} IL2rg ^{tm1Wj} /SzJ	NOD.CB17-Prkdc ^{scid} /J	NOD.CB17-Prkdc ^{scid} /NcrCrI	CB17.Cg-Prkdc ^{scid} Lyst ^{tg} -J/Cl	CB17/lcr-Prkdc ^{scid} /lcrIcoCrI	CAnN.Cg-Foxn1 ^{nu} /J	CAnN.Cg-Foxn1 ^{nu} /CrI	CrI:NU(NCr)-Foxn1 ^{nu}	CrI: NMRI-Foxn1 ^{nu}
Cepa	Diabéticos no obesos (NOD) (consanguínea)	Diabéticos no obesos (NOD) (consanguínea)	Diabéticos no obesos (NOD) (consanguínea)	Diabéticos no obesos (NOD) (consanguínea)	CB17 (consanguínea)	CB17 (consanguínea)	BALB/c (consanguínea)	BALB/c (consanguínea)	No consanguínea	No consanguínea
Genes mutados	Prkdc (mutación espontánea "scid") y IL2rg (knock out; transgénesis dirigida)	Rag1 (Knock out; transgénesis dirigida) y IL2rg (knock out; transgénesis dirigida)	Prkdc (mutación espontánea "scid")	Prkdc (mutación espontánea "scid")	Prkdc (mutación espontánea "scid") y Lyst (mutación espontánea "beige-J")	Prkdc (mutación espontánea "scid")	Foxn1 (mutación espontánea nude (nu))	Foxn1 (mutación espontánea nude (nu))	Foxn1 (mutación espontánea nude (nu))	Foxn1 (mutación espontánea nude (nu))
Células B maduras	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Normal	Normal	Normal	Normal
Células T maduras	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Células dendríticas	Deficiente	Deficiente	Deficiente	Deficiente	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Macrófagos	Deficiente	Deficiente	Deficiente	Deficiente	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Células NK	Ausente	Ausente	Deficiente	Deficiente	Deficiente	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Complemento Hemolítico	Ausente	Ausente	Presente	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Fugas (Leakiness)	Muy Baja	Ausente	Baja	Baja	Baja	Baja	No aplicable	No aplicable	No aplicable	No aplicable
Tolerancia a la radiación	Baja	Alta	Baja	Baja	Baja	Baja	Alta	Alta	Alta	Alta
Incidencia de tumores espontáneos	Baja	Baja	Alta (linfoma tímico)	Alta (linfoma tímico)	Alta (linfoma tímico)	Alta (linfoma tímico)	Baja	Baja	Baja	Baja
Pelo (color)	Si (albino)	Si (albino)	Si (albino)	Si (albino)	Si (albino)	Si (albino)	No	No	No	No

^aLa numeración de las tablas se ha llevado a cabo por orden alfabético del proveedor.

Más inmunodeficiencia

Menos inmunodeficiencia

REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA

ANIMALES DE LABORATORIO

VERANO 2021 / NÚMERO 90

Tabla 2.- Características de algunos de los modelos de ratones inmunodeprimidos que podemos adquirir en ENVIGO^a.

Nombre Común	B-NDG	R2G2	NOD.SCID	C.B-17 SCID	SCID/Beige	BALB/c nude	Athymic nude	NMRI nude
Nomenclatura completa	NOD.CB17- <i>Prkdc</i> ^{scid} <i>IL2rg</i> ^{tm1/Bcgen}	B6;129- <i>Rag2</i> ^{tm1Fwa1 I2rg^{tm1Rskj}DwHsd}	NOD.CB17- <i>Prkdc</i> ^{scid} /NCRHsd	C.B-17/ICrHsd- <i>Prkdc</i> ^{scid}	C.B-17/ICrHsd- <i>Prkdc</i> ^{scid} <i>Lyst</i> ^{tg-j}	BALB/cOlaHsd- <i>Foxn1</i> ^{nu}	Hsd: Athymic Nude- <i>Foxn1</i> ^{nu}	HsdCpb:NMRI- <i>Foxn1</i> ^{nu}
Cepa	Diabéticos no obesos (NOD) (consanguínea)	C57BL/6 y 129 (fondo mixto de 2 cepas consanguíneas; no se define cual es la cepa 129)	Diabéticos no obesos (NOD) (consanguínea)	CB17 (consanguínea)	CB17 (consanguínea)	BALB/cOlaHsd (consanguínea)	No consanguínea	No consanguínea
Genes mutados	<i>Prkdc</i> (mutación espontánea "scid") y <i>IL2rg</i> (knock out; transgénesis dirigida)	<i>Rag2</i> (Knock out; transgénesis dirigida) y <i>IL2rg</i> (knock out; transgénesis dirigida)	<i>Prkdc</i> (mutación espontánea "scid")	<i>Prkdc</i> (mutación espontánea "scid")	<i>Prkdc</i> (mutación espontánea "scid") y <i>Lyst</i> (mutación espontánea "beige-j")	<i>Foxn1</i> (mutación espontánea nude (nu))	<i>Foxn1</i> (mutación espontánea nude (nu))	<i>Foxn1</i> (mutación espontánea nude (nu))
Células B maduras	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Normal	Normal	Normal
Células T maduras	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Células dendríticas	Deficiente	Deficiente	Reducida	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Macrófagos	Deficiente	Deficiente	Reducida	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Células NK	Ausente	Ausente	Reducida	Normal	Reducida	Normal	Normal	Normal
Complemento Hemolítico	Ausente	No determinado	Reducido	Normal	No determinado	Normal	Normal	Normal
Fugas (Leakiness)	Baja	Baja	Baja	Media	Baja	No	No	No
Tolerancia a la radiación	Baja	Alta	Baja	Baja	Baja	Alta	Alta	Alta
Incidencia de tumores espontáneos	Baja	Baja	Alta (linfomas tímicos)	Baja	Baja	Baja	Baja	Baja
Pelo (color)	Si (albino)	Si (color canela claro)	Si (albino)	Si (albino)	Si (albino)	Posible crecimiento de pelo escaso e intermitente	Posible crecimiento de pelo escaso e intermitente	Posible crecimiento de pelo escaso e intermitente

^aLa numeración de las tablas se ha llevado a cabo por orden alfabético del proveedor.

Más inmunodeficiencia

Menos inmunodeficiencia

Tabla 3.- Características de algunos de los modelos de ratones inmunodeprimidos que podemos adquirir en Janvier^a.

Nombre Común	NXG	B6 R2G2	NOD-Scid	CB17 Scid	BALB/c Nude	NMRI Nude	ATHYMIC Nude
Nomenclatura completa	NOD- <i>Prkdc</i> ^{scid} <i>IL2rg</i> ^{tm1/Rj}	C57BL/6N- <i>Rag2</i> ^{tm1} - <i>IL2rg</i> ^{tm1/Rj}	NOD.CB17- <i>Prkdc</i> ^{scid} /Rj	CB-17/ICr- <i>Prkdc</i> ^{scid} /Rj	BALB/cAnN- <i>Foxn1</i> ^{nu/nu} /Rj	Rj:NMRI- <i>Foxn1</i> ^{nu/nu}	Rj:ATHYM- <i>Foxn1</i> ^{nu/nu}
Cepa	Diabéticos no obesos (NOD) (consanguínea)	C57BL/6N/Rj (consanguínea)	Diabéticos no obesos (NOD) (consanguínea)	CB17 (consanguínea)	BALB/c (consanguínea)	No consanguínea	No consanguínea
Genes mutados	<i>Prkdc</i> (mutación espontánea "scid") y <i>IL2rg</i> (knock out; transgénesis dirigida; expresa la variante Sirpa)	<i>Rag2</i> (Knock out; transgénesis dirigida) y <i>IL2rg</i> (knock out; transgénesis dirigida)	<i>Prkdc</i> (mutación espontánea "scid")	<i>Prkdc</i> (mutación espontánea "scid")	<i>Foxn1</i> (mutación espontánea nude (nu))	<i>Foxn1</i> (mutación espontánea nude (nu))	<i>Foxn1</i> (mutación espontánea nude (nu))
Células B maduras	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Normal	Normal	Normal
Células T maduras	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Células dendríticas	Deficiente	Deficiente	Baja	Deficiente	Normal	Normal	Normal
Macrófagos	Deficiente	Normal	Deficiente	Normal	Normal	Normal	Normal
Células NK	Ausente	Ausente	Deficiente	Normal	Normal	Normal	Normal
Complemento Hemolítico	Deficiente	Normal	Deficiente	Normal	Normal	Normal	Normal
Fugas (Leakiness)	Alguna	Alguna	Media	Alta	No	No	No
Tolerancia a la radiación	Baja	Alta	Baja	Baja	Alta	Alta	Alta
Incidencia de tumores espontáneos	Baja	No determinado	Alta	Baja	No determinado	No determinado	No determinado
Pelo (color)	Si (albino)	Si (negro)	Si (albino)	Si (albino)	No	No	No

^aLa numeración de las tablas se ha llevado a cabo por orden alfabético del proveedor.

Más inmunodeficiencia

Menos inmunodeficiencia

Excellence is built on long-term relationships



Aspen Bedding



Aspen Nesting
Material



Aspen Environmental
Enrichments

At Tapvei we are committed to delivering **great value** products around the world

- ✓ **SODISPAN RESEARCH, our distributor in Spain, will meet the specific needs of your research team**
- ✓ **Aspen Bedding, untreated raw material, no use of any gas or fuel during production, high absorption capacity**
- ✓ **With Tapvei products you can be sure your test results aren't affected by uncontrolled variables**

Please visit www.sodispan.com or contact sodispan@sodispan.com

www.sodispan.com

www.tapvei.com

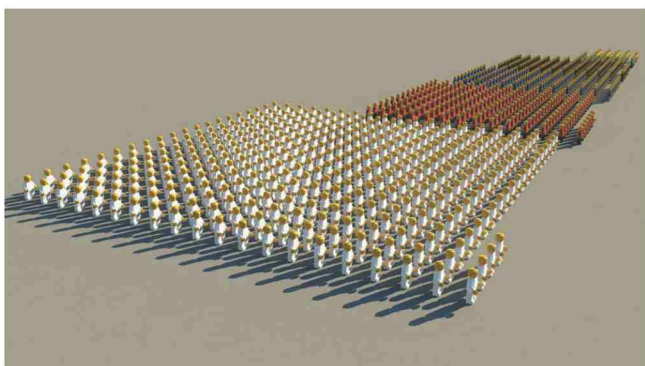
Cómo mejorar la reproducibilidad científica y reducir el número de animales desde los Órganos Habilitados

Alberto Pastor Campos

Oficina de Investigación Responsable, Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH)

Palabras clave: reducción, bioestadística, ética.

INTRODUCCIÓN



Nadie que lea este artículo desconocerá que los que trabajamos con animales de experimentación debemos tener siempre en mente la mejora continua de los procedimientos a través de la aplicación de los principios de las tres erres. Dichos principios, son no sólo un objetivo ético sino un imperativo legal.

Me centraré en esta ocasión en el papel de los Órganos Habilitados en una de las tres erres más importantes, si no la que más, **la reducción**. Seguramente, en este punto, alguien disientirá y considerará que el reemplazo es el objetivo más importante. Sin estar en desacuerdo, desde un punto de vista teórico, paso a exponer por qué considero la reducción la "R" más importante.

Si asumimos que el reemplazo total de los animales de experimentación, a día de hoy, es una tarea prácticamente imposible puesto que esto supondría frenar de manera brusca el avance biomédico, no quiero ni pensar cómo acabaría la pandemia de la COVID-19 sin usar animales en el desarrollo de las vacunas, nos encontramos en la situación de que siendo la "R" teóricamente más importante, desde un punto de vista

pragmático, nos da poco margen de actuación, a menos a corto plazo. En este punto, sé que, aunque estéis de acuerdo conmigo en la idea anterior, no tendréis tan claro que la reducción sea más importante que el refinamiento. No me malentendáis, el refinamiento es importantísimo, de hecho, desde nuestro perfil laboral tipo "secaler@s" con casi total seguridad es la "R" por la que más trabajamos. Nos obsesiona el bienestar animal, como no podría ser de otra manera. Pero precisamente por ello, porque creo que el refinamiento es la "R" con la que estamos más cómodos por nuestro perfil profesional, creo que tiene menos margen de mejora que la "R" de reducción. Considero la "R" de reducción la más importante por dos motivos: hay muchas cosas que se pueden hacer todavía para mejorar y la reducción no es otra cosa que un reemplazo parcial más fácilmente alcanzable. Por mucho que apliquemos técnicas de refinamiento serán eso, técnicas de refinamiento. A cuantos menos animales tengamos que aplicar dichas técnicas mejor.

Desde un punto de vista legal los Órganos Habilitados asumen la función de la evaluación de proyectos de investigación y docentes con animales. En el artículo 34 del *Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia*, encontramos que la evaluación del proyecto incluirá una evaluación de su conformidad con los requisitos de reemplazo, reducción y refinamiento. Por lo tanto, como miembros de un Órgano Habilitado evaluar el adecuado número de animales es una de nuestras misiones más importantes.

En un artículo anterior, comentaba que quizás desde los comités hemos enviado un mensaje equivocado sobre el número de animales, porque es importante destacar que uno de los principales motivos por los que los ensayos con animales son

difícilmente replicables se encuentra en la baja potencia estadística de los mismos o, dicho de otro modo, en el escaso número de animales empleado en los estudios. En resumen, hay que usar pocos, pero tantos como sean necesarios. La teoría está clara, pero ¿cómo se traduce eso en la práctica?

La respuesta es bien sencilla: debemos tener un/a bioestadístico/a en el Órgano Habilitado y cuanto más sepa mejor. Si alguien tiene dudas sobre la importancia de este aspecto lo mejor es que siga leyendo para que vea cómo esto que digo se traduce en resultados concretos.

INFORME COMPARATIVO DEL CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL ANTES Y DESPUÉS DE LA EVALUACIÓN DE LOS PROYECTOS APROBADOS EN EL AÑO 2020 EN LA UMH

Ni cortos ni perezosos, a principios del año pasado, nos propusimos medir con números la mejora en los números de animales gracias a la incorporación al Comité de Ética e Integridad en la Investigación (CEII) de la UMH de Victoria Fornés, una nueva compañera bioestadística.

El objetivo de este informe fue plasmar el resultado de las evaluaciones y el análisis íntegro que se realiza sobre los cálculos del tamaño muestral de las solicitudes de proyectos de investigación.

Victoria es la responsable de analizar la adecuación de los métodos utilizados para la estimación, los niveles de potencia estadística, el nivel de significación y otros factores estrechamente relacionados con el tamaño de la muestra, es la técnica estadística.

Para estudiar la eficacia de los asesoramientos realizados relativos al tamaño de la muestra de cada proyecto, se estudiaron todas las solicitudes de proyectos de experimentación en animales aprobados en el CEII a lo largo de 2020 (23 proyectos de 36 presentados).

Se recogió el número de animales de cada uno de los procedimientos incluidos en esas solicitudes y el total del proyecto, para poder comparar el número inicial propuesto por el/la investigador/a, con el número final de animales aprobados tras las revisiones y el asesoramiento estadístico.

Sin entrar en detalle en los números, la cantidad de animales aprobada se redujo de 7.057 animales a 5.531. Esto supone una

reducción de 1.526 animales entre el número inicial total propuesto en la primera versión de los proyectos y la versión final tras las recomendaciones del CEII y la adaptación por parte del equipo investigador. **Este descenso supuso una caída del 21,6% de los animales solicitados inicialmente.**

Aunque, de manera global, se observó una tendencia negativa entre la primera presentación del proyecto y la aprobación final, cabe destacar que los asesoramientos fueron diversos: **algunas recomendaciones resultaron en un aumento del tamaño muestral (6 proyectos)**, mientras que otras derivaron en una reducción del número de animales (5 proyectos).

Todos los comentarios de mejora realizados siguieron la misma línea: **proporcionar una justificación estadística adecuada que asegurara una potencia estadística del 80-90%, un nivel de significación de 0,05, la clara determinación de la/s hipótesis/s de contraste y la aproximación del efecto a contrastar.**

CONCLUSIONES

Ponga un/a bioestadístico/a en su vida. O, mejor dicho, en su Órgano Habilitado. De esta manera conseguirá reducir el número de animales utilizados y mejorar la reproducibilidad científica.

El diseño experimental y la estimación estadística del tamaño muestral de los experimentos en los proyectos de investigación son aspectos fundamentales para promover la "R" de Reducción. En este informe, a modo de ejemplo, se ha podido constatar que tras la consulta y asesoramiento estadístico se consiguió reducir, de manera global, un 21,6% los animales en experimentación solicitados en un año, a pesar de haberse modificado tanto de manera positiva como negativa el número de animales en distintos proyectos.

Precisamente, el aumento del número de animales en algunos de los proyectos permitió, además, garantizar en todos los proyectos evaluados niveles de potencia estadística y de significación adecuados, lo que sin duda contribuirá a la mejora de la reproducibilidad científica de los estudios con animales realizados en la UMH.



Un modelo al lado de los humanos

Muestras de leche, heces o hisopos vaginales de esta cierva roja (*Cervus elaphus*) han brindado, a un grupo de investigadores españoles y holandeses, información importante para comprender la epidemiología de *Coxiella burnetii* en la interfaz vida silvestre-ganado-humanos

Coxiella burnetii es el agente causante de la fiebre Q, una zoonosis que afecta a humanos y mamíferos en todo el mundo. En Europa, los genotipos de esta bacteria que circulan entre rumiantes domésticos y humanos son conocidos. Por el contrario, la información sobre la relevancia de los hospedantes silvestres en la ecología de *C. burnetii* es escasa y los genotipos que circulan en la vida silvestre rara vez se han identificado.

Los investigadores han identificado estos genotipos y sugieren que la fauna silvestre, y el ciervo rojo, pueden ser fuentes importantes de *C. burnetii* para humanos.



www.secal.es



Powering your research development



Profesionales al servicio de la investigación

Servicios integrales para Animalarios

Externalización de servicios de Animalarios

Formación de personal

Diseño de Instalaciones

Alquiler y gestión de Instalaciones

Consultoría y Asesoramiento



www.vivotecnia-ms.com

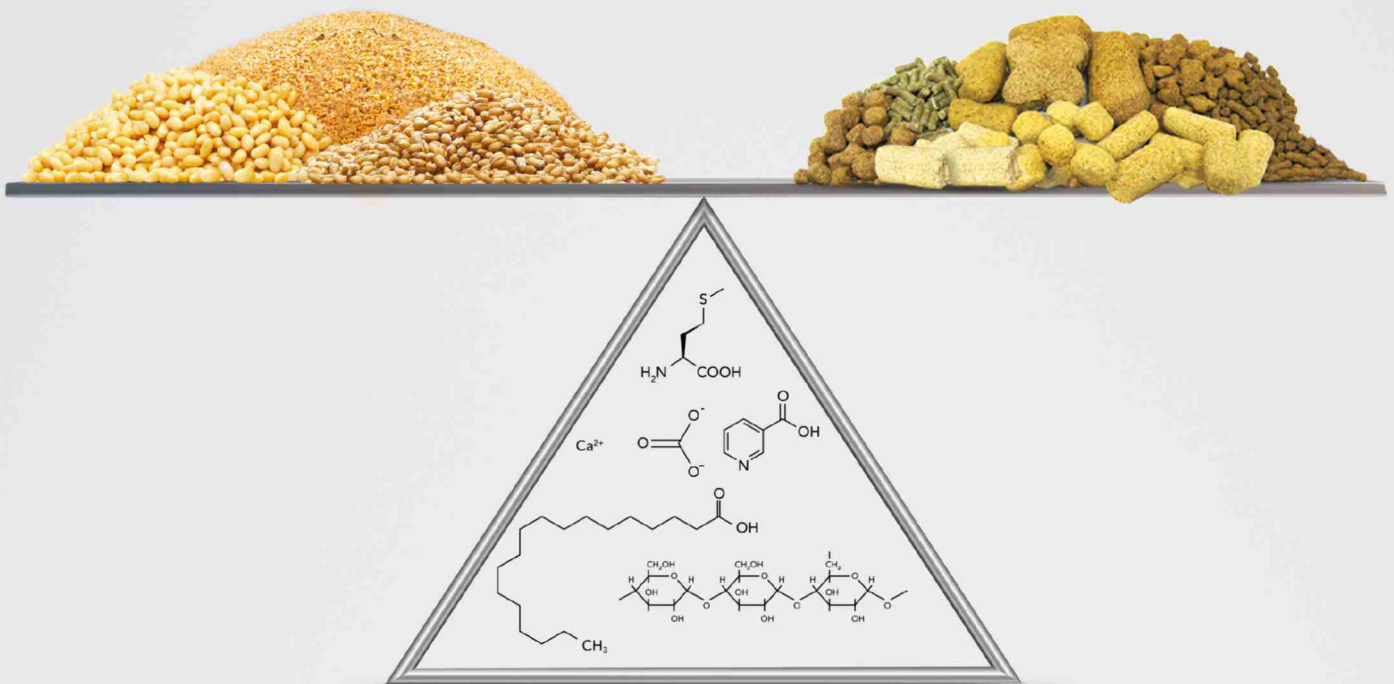


The Weight is Over.

No longer do you need to spend your time conditioning research models. There is now an immediate solution - Preconditioning Services from Charles River. Whether preparation for your study requires feeding special diets, aging of animals, phenotypic evaluations, or surgical manipulations, Charles River can provide you with animals preconditioned to your parameters and ready for use when they enter your facility.
For more information, please contact us at services@eu.crl.com

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

+

+

+