

# ANIMALES DE LABORATORIO

PRIMAVERA 2022 / NÚMERO 93



sociedad española  
para las ciencias  
del animal de laboratorio

**Histología de la porción distal del aparato digestivo y del hígado de las aves de corral.**

---

**Métodos computacionales de vanguardia para predecir la toxicidad acuática de productos biocidas, medicamentos y cosméticos.**

---

**Entrevista a Conchi Timón Esteban.**

# 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](http://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.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  
lpgtextil@gmail.com

### DEPÓSITO LEGAL

M-1362-1999

## Transparencia

Desde la dirección de la revista *Animales de Laboratorio* seguimos comprometidos con el Acuerdo de transparencia sobre el uso de animales en experimentación científica en España, promovido por COSCE con el objetivo de establecer vías de comunicación entre la comunidad científica y la sociedad sobre cuándo, cómo y por qué se usan animales en investigación y los beneficios que se derivan de esta práctica, a compartir información de forma transparente, y a fomentar la comunicación acerca de la investigación con animales para hacer llegar al público toda la información sobre las razones, los métodos y el avance en el conocimiento que la misma genera y que justifica el uso de animales en investigación científica. Con este compromiso, incluimos una nueva sección a la revista llamada "Transparencia y divulgación", de la cual será responsable Isabel Blanco y en la que se van a mostrar todas aquellas propuestas, experiencias y proyectos de divulgación que se llevan a cabo para llevar la experimentación animal a toda la sociedad, así como una mirada crítica y constructiva a la manera en cómo se comunica.

Seguimos trabajando con el objetivo de mejorar y actualizar esta nuestra revista, por este motivo, la sección "Tinciones y tejidos" pasa a llamarse "Histopatología" para así tratar temas relacionados con el valor diagnóstico de la histología, así como diferentes técnicas de estudio y su refinamiento, en función del tejido y el animal de interés. Y la sección "In vitro" pasa a llamarse "Métodos alternativos" para así poder abarcar diferentes tecnologías y métodos alternativos encaminados al reemplazo animal.

Este número viene cargadito y en él podréis disfrutar de cada una de sus secciones, así como del póster ganador del Premio de los asistentes "Las Seis Cs en la Cultura del Cuidado".

¡Disfruten de su lectura!

### Dirección de la revista

# EDITORIAL

## JUNTA DE GOBIERNO

### PRESIDENCIA

Juan Rodríguez Cuesta (2019-2023)

### SECRETARÍA

Mónica Gómez-Juárez Sango (2019-2023)

### TESORERÍA

Marta Miró Murillo (2019-2023)

### VOCALÍAS (2019-2023)

Clara Sánchez González  
Carlos Carnero Guerrero  
Garikoitz Azkona Mendoza

### VICEPRESIDENCIA

Ángel Naranjo Pino (2021-2025)

### VICESECRETARÍA

Alberto Espinal Villamayor (2021-2025)

### VICETESORERÍA

Gema Luque Díez (2021-2025)

### VOCALÍAS (2021-2025)

IDEXX representado por David Mayo López  
Yolanda Miralles López

# 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.
- ▶ 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**  
ruben.mota.blanco@csic.es



Publicidad  
**DAVID  
MAYO LÓPEZ**  
publicidad.revista@secal.es

## RESPONSABLES DE SECCIÓN



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



Transparencia y divulgación  
**ISABEL  
BLANCO GUTIÉRREZ**  
iblanco@cnio.es



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  
**JOSE M<sup>o</sup>  
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



Métodos alternativos  
**GUILLERMO  
REPETTO KUHN**  
grepkuh@upo.es



Bienestar animal  
**GARIKOITZ  
AZKONA MENDOZA**  
gazkona@gmail.com



CEEA-OH  
**ALBERTO  
PASTOR CAMPOS**  
albertopastor@umh.es



Histopatología  
**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  
**CARLOS  
CARNERO GUERRERO**  
ccarnero@quironosalud.es

Han colaborado en este número:

**Carme Cucarella**, Servicio de transgénesis y biotecnología del IBV-CSIC; **Elisabet Tetas Casals**, con la imagen de la portada.

**Cursos reconocidos por la autoridad competente de España para la obtención de todas las Funciones de experimentación animal legalmente establecidas en Europa. 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

- Comunicado de la Comisión COSCE de Estudio del Uso de Animales en Investigación Científica.
- La Universidad de Sevilla organiza un acto de homenaje póstumo a nuestro compañero el Dr. Oscar Pintado Sanjuán.
- La Comisión Europea responde a la resolución del Parlamento Europeo para acelerar la eliminación de la investigación con animales, reconociendo su importancia vital.

## 15 ACTUALIDAD

- Así se investiga con ratones en la Universidad del País Vasco.
- Las pequeñas vidas que impulsan a la ciencia en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca.
- La extrema bioseguridad del Centro de Investigación en Sanidad Animal.
- Investigación con ratones: por qué el sexo sí importa.
- La Universidad Miguel Hernández publica el diario interactivo "Noticias Animales" con contenidos sobre modelos en experimentación animal.
- Científicos chinos publican cómo consiguen que una ratona tenga crías sin necesidad de esperma ni sexo.
- Un 79% de los suizos rechazó prohibir los experimentos con seres vivos.

## 21 TRANSPARENCIA Y DIVULGACIÓN

- Presentación de la nueva sección Transparencia y divulgación.

## 23 TÉCNICAS

- Técnica ciega de administración intratraqueal de sustancias en ratones: simplificando la metodología.

## 27 SEGURIDAD EN 5 MINUTOS

- Riesgos laborales asociados al humo quirúrgico.

## 29 AL CUIDADO

- Validación de procesos de esterilización con autoclave y de desinfección de alto nivel mediante generadores de vapor de peróxido de hidrógeno.

## 35 ¿Y TÚ QUÉ OPINAS?

- El estrés se representa en rojo, pero... lo paga "la blanca".

## PÓSTER

- Premio de los asistentes "Las Seis Cs en la Cultura del Cuidado".

## 37 REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA

- Criopreservación en pez cebra.

## 43 MÉTODOS ALTERNATIVOS

- Métodos computacionales de vanguardia para predecir la toxicidad acuática de productos biocidas, medicamentos y cosméticos.

## 49 BIENESTAR ANIMAL

- Desarrollo de una escala de expresión facial en cerdas usando el parto como modelo de dolor.

## 55 HISTOPATOLOGÍA

- Histología de la porción distal del aparato digestivo y del hígado de las aves de corral.

## 61 ABSLab

- Diseño de una Sala de Nivel 2 de Contención Biológica (NCB2).

## 68 ENTREVISTA

- Entrevista a Conchi Timón Esteban, Técnico de Animalario en el CNIO.



# 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

## Comunicado de la Comisión COSCE de Estudio del Uso de Animales en Investigación Científica



**CONFEDERACIÓN DE SOCIEDADES  
CIENTÍFICAS DE ESPAÑA**

**Palabras clave:** manifiesto, investigación, avance.

**La Comisión COSCE de Estudio del Uso de Animales en Investigación Científica publica el presente comunicado que clarifica la realidad sobre la investigación con modelos animales en España, e incide en recalcar la necesidad de su uso para el avance de la ciencia.**

En los últimos meses, se han publicado diversas noticias relativas a la experimentación animal a partir de las cuales se podría entender que es posible prescindir de estas prácticas en investigación biomédica. Al mismo tiempo, consideramos que estas publicaciones estigmatizan a los investigadores y a todos los profesionales encargados del cuidado y bienestar de estos animales, que, en su conjunto, desarrollan su actividad de forma honesta y responsable.

Por medio de este comunicado queremos poner de manifiesto que ese mensaje transmitido no se corresponde con la realidad existente en nuestro país.

***La investigación con modelos animales es esencial para el avance del conocimiento científico.***

La experimentación animal ha ayudado a comprender el funcionamiento de los organismos, y a desarrollar tratamientos y medicamentos de uso humano y veterinario fundamentales que utilizamos hoy en día.

Destacamos los anestésicos, los antibióticos, y las vacunas como las de la COVID-19, sin olvidar las vacunas contra la poliomielitis, tétanos, papilomavirus, etc. Además, le debemos a la experimentación animal el desarrollo de terapias contra el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades raras, etc. La experimentación animal ha sido básica también para el desarrollo de equipamientos médicos que permiten la cirugía mínimamente invasiva, y métodos fundamentales de exploración con imagen como la resonancia magnética.

Casi todos los premios Nobel de Fisiología o Medicina han utilizado animales en sus investigaciones pioneras.

La experimentación animal sigue siendo necesaria también para evaluar la toxicidad, seguridad y eficacia de medicamentos, vacunas y otros productos destinados al ser humano, pero también a los animales de compañía y a los usados en ganadería.

***La experimentación con animales es una de las actividades científicas más estrictamente reguladas y supervisadas.***

Todos los investigadores de nuestro país deben cumplir con legislaciones autonómicas, nacionales y europeas que delimitan y controlan lo que puede y no puede hacerse.

En los centros de investigación, los comités de ética se encargan de evaluar las solicitudes para utilizar animales de experimentación y en última instancia la autoridad competente, en nuestro país en las comunidades autónomas, es quien autoriza, o no, el uso de estos animales en experimentos.

Adicionalmente, es también la autoridad competente la encargada de supervisar el cumplimiento de los procedimientos autorizados y la salvaguarda del bienestar animal, así como de sancionar a aquellas personas o instituciones que, tras ser investigadas, se constata que han vulnerado la normativa vigente.

**Toda persona que cuide o use animales para experimentación debe ser formada y estar capacitada para realizar cualquiera de estas funciones:** atención a animales, eutanasia, realización y diseño de procedimientos, responsable de bienestar animal y veterinario designado. Esto se lleva a cabo a través de módulos formativos específicos, y tras un período de supervisión. La formación debe realizarse de forma continua y actualizarse cada cierto tiempo, según la legislación y siempre bajo control de la autoridad competente.

Los principios que presiden la experimentación con respecto al bienestar de los animales son: Reemplazo, Reducción y Refinamiento de los procedimientos de cuidado y uso.

***Solo se utilizan animales de experimentación en investigación científica o docencia superior cuando no existan métodos alternativos que permitan evitar la utilización de animales.***

De hecho, entre 2009 y 2020, periodo del que tenemos datos oficiales del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), se ha producido un descenso del 46% en el uso de animales. De modo global, se utiliza el menor número de animales compatible con la obtención de resultados concluyentes. Y se utilizan siempre los métodos más avanzados que permitan minimizar cualquier daño o dolor en los animales, promoviendo su bienestar.

Generalmente, antes de llegar a la experimentación animal hay un gran trabajo previo de experimentación *in vitro*, fundamental en investigación básica y a partir del cual, por ejemplo, se puede continuar con ensayos animales con aquellos candidatos a medicamento que han mostrado resultados prometedores en las fases previas.

En todo momento se promueve el desarrollo de métodos alternativos con el fin de sustituir el uso de animales y a la vez mantener el necesario rigor científico. A nivel europeo existe el

centro de referencia europeo de validación de métodos alternativos (ECVAM).

***Los métodos alternativos son cada vez más y mejores, pero todavía no pueden sustituir totalmente a los animales.***

El uso de animales destinados a investigación científica básica supone aproximadamente el 80% de los usos de animales en nuestro país, de acuerdo con las cifras publicadas anualmente por el MAPA. El 20% restante corresponde a la llamada investigación regulada o reglamentaria:

- El uso de animales es obligatorio en las fases del desarrollo preclínico de medicamentos, para evaluar su seguridad y eficacia, previa a su uso en la especie de destino, ya sea el humano u otro animal.
- Los estudios con animales también son obligatorios para productos químicos de consumo, para evaluar su seguridad para el hombre, los animales y el medio ambiente.
- Estos usos están tipificados y estandarizados y son requeridos por las diferentes agencias reguladoras para poder aprobar finalmente medicamentos, vacunas u otros productos destinados a humanos o al resto de animales.
- Todos los medicamentos y vacunas han de ser validados previamente en animales (en una o varias especies, según los casos), cumpliendo además con una normativa estricta (BPLs o Buenas Prácticas de Laboratorio) para establecer su seguridad y eficacia, antes de poder ser evaluados en personas, a través de los conocidos ensayos clínicos con sus diferentes fases (I, II, III y IV).

Desde la COSCE, en septiembre de 2016, lanzamos el acuerdo por la transparencia en experimentación animal para promover el conocimiento de por qué, dónde, para qué, cuándo y cuántos animales se dedican a la experimentación en nuestros centros de investigación. A este acuerdo, recogido en cuatro compromisos que persiguen comunicar con claridad a toda la ciudadanía las razones por las cuales se siguen usando animales de experimentación, se han adherido ya 153 instituciones de todo el país. Entre ellas hay universidades, centros de investigación, sociedades científicas, empresas del sector, asociaciones de

pacientes, hospitales, parques científicos y organismos públicos de investigación.

Este acuerdo español promovido desde la COSCE es el que acoge un mayor número de instituciones nacionales de todos los acuerdos de transparencia lanzados ya en todo el mundo.

Creemos firmemente que solamente **desde la información rigurosa y veraz sobre experimentación animal, que debemos y queremos proporcionar a los ciudadanos**, podremos avanzar en la normalización de una actividad científica tan relevante, que

ha permitido que hoy en día dispongamos de medicamentos, vacunas y tratamientos seguros y eficaces para todos, y que sigamos avanzando, hasta incluso conseguir órganos de otros animales que empiezan a poder ser trasplantados a personas, para suplir las limitadas e insuficientes donaciones de órganos humanos.

- Enlace de la noticia <https://cosce.org/comunicado-de-la-comision-cosce-de-estudio-del-uso-de-animales-en-investigacion-cientifica/>

## La Universidad de Sevilla organiza un acto de homenaje póstumo a nuestro compañero el Dr. Oscar Pintado Sanjuán



**Palabras clave:** homenaje, Universidad, recuerdo.

Nuestra compañera **Cristina Pichardo** nos ha enviado estas líneas sobre el homenaje a **Óscar Pintado** que se celebró el pasado 3 de marzo:

«El acto fue organizado por la Universidad de Sevilla y se celebró en dos partes, la primera en el Salón de actos del IBiS, presidido por el

rector de la Universidad de Sevilla, **Miguel Ángel Castro**, con las intervenciones de los Profesores **Rafael Fernández Chacón**, director del IBiS, y **José López Barneo**, que ha hablado en representación de la familia de Óscar.

En la segunda parte nos desplazamos al Edificio CITIUS III Manuel Losada Villasante, donde se ha descubierto una placa en recuerdo de Óscar en el Centro de Experimentación Animal que ya lleva su nombre (Centro de Experimentación Animal Óscar Pintado), situado en este edificio. En el jardín de este edificio se plantó hace unos meses un naranjo, procedente del antiguo animalario de Espartinas (del que Óscar fue director durante más de 20 años antes de trasladarse a este nuevo centro que ahora lleva su nombre), junto a este árbol tomamos la palabra **Pilar González** (Técnico del CEA que llevaba trabajando con Oscar desde sus inicios) en nombre de los trabajadores de su centro y yo misma en mi nombre y en el de **Itziar Benito** (Directora actual del CEA Óscar Pintado), como compañeras de Óscar.

Un abrazo. Cristina»

- Enlace de la noticia <https://www.us.es/actualidad-de-la-us/homenaje-oscar-pintado-sanjuan>

# 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

## La Comisión Europea responde a la resolución del Parlamento Europeo para acelerar la eliminación de la investigación con animales, reconociendo su importancia vital

**Palabras clave:** resolución, Europa, experimentación animal.

El 16 de septiembre de 2021, el **Parlamento Europeo** aprobó una resolución, por una gran mayoría (667 a favor, 4 en contra, 16 abstenciones), en la que conminaba a la **Comisión Europea** a acelerar la transición hacia la eventual finalización del uso de animales de experimentación:

*European Parliament resolution of 16 September 2021 on plans and actions to accelerate the transition to innovation without the use of animals in research, regulatory testing and education (2021/2784(RSP)).*

El 10 de febrero de 2022, la Comisión Europea finalmente respondió a la resolución del Parlamento Europeo.

En este documento se facilita una respuesta, punto por punto, a la resolución; resaltando que sigue siendo necesaria la

experimentación animal regulada para todos aquellos procedimientos para los cuales no hay métodos alternativos validados disponibles, y su importancia capital en el desarrollo de nuevas medicinas y tratamientos en biomedicina.

La **European Animal Research Association (EARA)** ha publicado un análisis detallado de esta respuesta <https://www.eara.eu/post/eara-applauds-european-commission-for-rejecting-calls-for-phase-out>

- Enlace a la respuesta de la Comisión Europea <https://oeil.secure.europarl.europa.eu/oeil/spdoc.do?i=57777&j=0&l=en>

ANIMALES  
DE LABORATORIO

PUBLICA TUS  
ARTÍCULOS EN  
NUESTRA REVISTA.  
¡CONTÁCTANOS!



¿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](mailto: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

## Así se investiga con ratones en la Universidad del País Vasco

**Palabras clave:** transparencia, UPV-EHU, animalario.

El diario “El Correo” ha entrado en las instalaciones de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU) para realizar un extenso reportaje de sus instalaciones y actividades. Este es un extracto del artículo de Luís Alfonso Gámez publicado el 4 de marzo.

En el animalario de la UPV/EHU –que lleva el nombre de la neuróloga italiana y nobel de Fisiología o Medicina Rita Levi-Montalcini (1909-2012)– se llevan a cabo proyectos de investigación en cáncer, Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple, trastornos del espectro autista y enfermedades raras como los síndromes de Angelman y de Dravet. La investigación con animales de laboratorio sigue siendo imprescindible para paliar el sufrimiento en humanos y también en animales. Aunque se ha demostrado que los modelos *in vitro* funcionan, de momento, un cultivo celular aún no se equipara a un ser vivo.

El animalario Rita Levi-Montalcini es una de las instalaciones de acceso más restringido de la UPV/EHU. Un lugar silencioso e impoluto donde viven ratas y ratones, en los que los científicos desarrollan sus estudios sobre enfermedades actuales que sirven para comprenderlas mejor y desarrollar nuevas terapias contra ellas. “Es uno de nuestros centros con más controles sobre quién entra, para qué y cómo hace su trabajo”, asegura Itziar Alkorta, química y directora de los Servicios Generales de Investigación (SGIker) de la UPV/EHU.

La unidad central está en Leioa junto a la Facultad de Medicina y Enfermería, y hay otras dos más pequeñas en Vitoria y San Sebastián. “Los animalarios de Álava y Gipuzkoa tienen finalidades científicas más concretas. No abarcan toda la gama de experimentos que se hacen aquí”, apunta Alkorta. La unidad del campus de Bizkaia, que ocupa 490 metros cuadrados, se divide en tres zonas: ratones, ratas y, separada de ambas, una tercera para la cría de estos animales. Esta última es de entrada aún más restringida, para que los roedores crezcan en un espacio libre de microorganismos.

En Leioa, los investigadores trabajan con ratas Sprague Dawley (albinas y muy tranquilas) y con ratones modificados genéticamente, para simular enfermedades humanas o para controlar la expresión de determinadas proteínas. “Ocasionalmente, puede haber algunos conejos, pero no es lo habitual”, dice la bióloga Arantza Alejo, técnica responsable de las instalaciones. Además, en la Estación Marina de Plentzia (PIE), emplean peces en estudios que también precisan de la autorización del comité de ética. “Los ratones modificados genéticamente no son cocos. Son ratoncillos normales, generalmente de salud más débil”, apunta Susi Marcos, bióloga y asesora de ética en la investigación y la docencia de la UPV/EHU; de hecho, una habitación especial acoge ratones inmunodeprimidos para el estudio del cáncer. En esa sala hay ejemplares con pelo y también sin él – los llamados *nude* (por desnudo en inglés)–, y los científicos disponen para su manejo de una cabina de flujo laminar, donde el aire se mantiene siempre limpio.

Además de adquirir ratones inmunodeprimidos a empresas especializadas y de obtener otros animales de instituciones científicas, el animalario de la UPV/EHU cuenta con producción propia de ratas y ratones. “En el área de reproducción y cría, hay ahora unos 950 ejemplares de 24 líneas de animales modificados genéticamente”, indica Alejo. Esa zona está aislada del resto de las instalaciones, solo puede accederse a ella previa ducha, y todo el material es debidamente esterilizado para impedir que se cuele ningún agente patógeno.

- Artículo completo <https://www.elcorreo.com/ciencia/vida/ratones-mejor-cuidados-20220223134656-ntrc.html>

## Las pequeñas vidas que impulsan a la ciencia en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca

**Palabras clave:** transparencia, Salamanca, animalario.

La Gaceta de Salamanca ha visitado las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca. Este es un extracto del artículo de Roberto Zamarbide publicado el 7 de marzo.

El Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca de la plataforma *Nucleus* gestiona desde 1994 las necesidades de investigación y docencia. Las nuevas instalaciones que se pusieron en marcha en el Edificio Departamental sustituyeron a los antiguos animalarios de la Facultad de Medicina en la calle Espejo y otros dos locales en la Facultad de Medicina y en la de Ciencias, que fueron desmantelados.

Ya en el nuevo siglo, las crecientes demandas de ratones modificados genéticamente y la creación del Centro de Investigación del Cáncer (CIC), llevaron a la Universidad a construir el actual animalario anexo al CIC, que recibe la denominación de Animalario OMG (Organismos Modificados Genéticamente). La obra de la instalación subterránea supuso una inversión de 6 millones de euros y se inauguró en 2005. Dos años después, el Servicio de Experimentación Animal se amplió con un nuevo animalario en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCYL) al servicio de los investigadores del centro.

Las especies de roedores son mayoría en los animalarios de esta Universidad. Ratones sobre todo, pero también ratas y hámsteres,

son utilizados para estudios de biología fundamental, nuevos tratamientos de cáncer, fisiología y farmacología. También se emplean para investigación en neurociencia, estudiar nuevas funciones en animales modificados genéticamente, así como el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos. El parecido genético con los seres humanos, su prolificidad y su bajo coste, hacen de los ratones los modelos más versátiles.

Ya a menor escala, los cerdos son empleados ocasionalmente por los cirujanos para practicar nuevas técnicas de mínima invasión o para probar nuevos sistemas robóticos en estudios de cirugía experimental. También especies de ranas y de peces se utilizan en estudios de biología molecular. La transparencia y gran tamaño de sus embriones facilitan la manipulación genética y su seguimiento *in vivo* al contar, además, con un gran número de muestras. Finalmente, los conejos son utilizados en estudios de toxicología, generación de anticuerpos, así como traumatología y cirugía reparadora, aspectos en los que el tamaño del animal es una ventaja.

- Artículo completo <https://www.lagacetadesalamanca.es/salamanca/las-pequenas-vidas-que-impulsan-a-la-ciencia-DG10610056>

## La extrema bioseguridad del Centro de Investigación en Sanidad Animal

**Palabras clave:** transparencia, CISA, bioseguridad.

Periodistas de EL MUNDO han accedido al interior del laboratorio con mayor seguridad biológica de España, el Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA). Dentro, sus científicos han contado en qué están trabajando y cómo se protegen –y nos protegen– al resto de los virus con los que experimentan.

- Vídeo completo <https://videos.elmundo.es/v/l6M04Emitco-la-extrema-bioseguridad-del-centro-de-investigacion-en-sanidad-animal>



## Investigación con ratones: por qué el sexo sí importa

**Palabras clave:** ratones, sexo, CIB.

Este vídeo forma parte de una campaña que pretende concienciar y visibilizar los sesgos de género presentes en el ámbito de la investigación, así como sus consecuencias para la salud de las mujeres. La serie surge de la colaboración entre el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) Margarita Salas, a través de sus Comisiones de Igualdad de Género e Investigación y Sociedad, y Anna Aguiló, Tatiana López y Pau Sanclemente.

- Vídeo completo <https://www.youtube.com/watch?v=MehPDpGGr-Y>



## La Universidad Miguel Hernández publica el diario interactivo "Noticias Animales" con contenidos sobre modelos en experimentación animal

**Palabras clave:** transparencia, UMH, actividades.

En este diario interactivo publicado por la Universidad Miguel Hernández, podemos encontrar desde una entrevista a un ratón hasta cómo las moscas pueden ayudar a prevenir el cáncer, o cómo los peces podrían dar pistas para curar infecciones.

Haz clic en los iconos en la web y descubre sus contenidos.

- Diario interactivo <https://umhsapiens.com/noticias-animales/>



## Científicos chinos publican cómo consiguen que una ratona tenga crías sin necesidad de esperma ni sexo

**Palabras clave:** reproducción, edición genética, ratones.

Un equipo de científicos chinos demuestra que la edición genética de un óvulo sin fecundar permite a los mamíferos generar crías.

Científicos chinos han conseguido que una ratona tenga crías vivas a partir de un óvulo no fecundado, gracias a la edición genética. Se trataría del primer mamífero que consigue, mediante esta técnica, la reproducción asexual conocida como partenogénesis. Este fenómeno es relativamente frecuente en insectos y en reptiles por ejemplo, los que están reclusos en zoos

sin machos, e incluso en aves. Hasta hace muy poco se pensaba que la partenogénesis era imposible en los mamíferos.

- Artículo completo <https://elpais.com/ciencia/2022-03-08/cientificos-chinos-consiguen-que-una-ratona-tenga-hijos-sin-necesidad-de-esperma-ni-sexo.html>

## Un 79% de los suizos rechazó prohibir los experimentos con seres vivos

**Palabras clave:** referéndum, Suiza, experimentación.

Un 79,08% de los participantes en el referéndum celebrado en Suiza, el domingo 13 de febrero, votaron en contra de la proposición legislativa de iniciativa popular (avalada por grupos animalistas) que pretendía "la prohibición de la experimentación animal y humana".

Todos los partidos consideraron el texto extremo. Ni siquiera la Sociedad Suiza para la Protección de los Animales (SPA), que está a favor de una mejor promoción de los métodos alternativos, se mostró a favor. El gobierno argumentó que si esta iniciativa fuese aprobada no se podrían haber utilizado las vacunas contra la COVID-19 en el país.

Las autoridades suizas y las empresas farmacéuticas argumentaban que la experimentación con animales es vital para el progreso de las ciencias médicas, como se ha demostrado en la actual pandemia, en la que muchas vacunas tuvieron que ser primero testadas en animales.

Pero, además, temían que un eventual "sí" a la iniciativa supusiera un duro golpe a la economía nacional, dado que el sector farmacéutico con multinacionales locales como Roche o Novartis a la cabeza, genera un 9% del PIB suizo y supone casi la mitad de sus exportaciones.

En el referéndum, los suizos votaron "no" por cuarta vez a la prohibición de los ensayos con animales. Anteriormente, las iniciativas populares sobre el tema fueron rechazadas en 1985 (por el 70%), 1992 (por el 56%) y 1993 (por el 72%). Los resultados demuestran que los suizos confían en la legislación en vigor, una de las más estrictas del mundo. Según esta legislación, los laboratorios que empleen animales en sus ensayos deben

demostrar que no existe otra opción y que los beneficios para la sociedad son mayores que el sufrimiento infligido.

La iniciativa había sido lanzada por un grupo de ciudadanos del cantón de San Gall –entre los que se encontraban un naturópata, un médico de cabecera y un agricultor ecológico– y pretendía prohibir en Suiza utilizar animales en la investigación. Los promotores de la prohibición argumentaban que ya existen alternativas a la experimentación animal como el uso de biochips, las simulaciones por ordenador o los "tests" con pequeñas dosis de fármacos en humanos. Además, se prohibiría la importación de nuevos medicamentos desarrollados con estos métodos.

En 2020 se utilizaron 560.000 animales en experimentos en Suiza, en su mayoría (400.000) ratas, ratones y otros pequeños roedores, también unos 4.600 perros, 1.500 gatos, 1.600 caballos y en menor medida: primates, vacas, cerdos, peces y pájaros, según estadísticas estatales.

### Enlaces relacionados

- [https://www.abc.es/sociedad/abci-78-por-ciento-suizos-rechazo-prohibir-experimentos-seres-vivos-202202141818\\_noticia.html](https://www.abc.es/sociedad/abci-78-por-ciento-suizos-rechazo-prohibir-experimentos-seres-vivos-202202141818_noticia.html)
- <https://www.lavanguardia.com/natural/20220214/8055252/suiza-sera-primer-pais-mundo-prohibir-experimentacion-animal.html>
- [https://www.swissinfo.ch/spa/experimentaci%C3%B3n-animal\\_los-suizos-rechazan-en-refer%C3%A9ndum-prohibir-la-experimentaci%C3%B3n-animal/47344426](https://www.swissinfo.ch/spa/experimentaci%C3%B3n-animal_los-suizos-rechazan-en-refer%C3%A9ndum-prohibir-la-experimentaci%C3%B3n-animal/47344426)



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](http://www.granjasanbernardo.com)

## Presentación de la nueva sección Transparencia y divulgación

Queridos compañeros,

Es un placer para mí presentaros la nueva sección de **Transparencia y divulgación**.

Seguimos cumpliendo con los objetivos marcados y que están recogidos en los estatutos de nuestra Sociedad: comunicar lo que hacemos, como lo hacemos e intentando convencer desde el conocimiento.

Con esta breve carta quiero animaros a participar en esta sección, contando vuestras experiencias y puntos de vista al poner en marcha proyectos de divulgación y transparencia a la Sociedad. Vuestras ideas pueden ser muy útiles y pueden ayudar a otros centros a mejorar en la comunicación, fundamental en estos tiempos tan convulsos.

Pero me gustaría ir más lejos y que este espacio fuera un lugar de reflexión sobre cómo educamos a la Sociedad edulcorando la información que transmitimos. En este sentido la diversidad de opiniones y la veracidad de la misma es fundamental para que la información nos enriquezca. Necesitamos aprender a hablar a un amigo, familiar o a toda la Sociedad, sin mostrar sentimiento de culpabilidad por lo que hacemos.

Solo necesitamos un máximo de 1000 palabras que expresen vuestra experiencia y reflexión en materia de transparencia y divulgación. Así que, os animo a mandarme la idea al correo **iblanco@cniio.es**

No lo dudéis, vuestras ideas pueden contribuir y mejorarnos a todos.

Isabel Blanco Gutierrez

## Todo lo que necesitas saber

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

[publicidad.revista@secal.es](mailto:publicidad.revista@secal.es)



[www.secal.es](http://www.secal.es)

## 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 CO<sub>2</sub> 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 CO<sub>2</sub> 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

For more information, visit [sodispan.com](http://sodispan.com)  
Sodispan Research s.l. exclusive representative in Spain and Portugal

## Técnica ciega de administración intratraqueal de sustancias en ratones: simplificando la metodología

María Teresa de Francisco Casado<sup>1</sup>, Josep Mercader Barceló<sup>2</sup> y Carlos Rio Bocos<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Estabulario, Servicios Científico Técnicos, Universidad de las Islas Baleares

<sup>2</sup>Grupo de investigación Biología Molecular y Salud Global (MoONE), Departamento de Biología Fundamental y Ciencias de la Salud, Universidad de las Islas Baleares

<sup>3</sup>Fundación Instituto de Investigación Sanitaria Islas Baleares (IdISBa), Hospital Universitario Son Espases

**Palabras clave:** intratraqueal, ciega, roedor.

### INTRODUCCIÓN

La administración intratraqueal de sustancias es una técnica básica utilizada en animales de experimentación, que permite su distribución uniforme y directa en los pulmones.

Existen otros tipos de administraciones para lograr la distribución de sustancias en el aparato respiratorio (inhalación, administración con pipeta en las fosas nasales y traqueotomía), pero sin duda la técnica más efectiva, y menos cruenta respecto a la traqueotomía, es la administración intratraqueal, ya que aseguramos que la sustancia ha llegado con la dosis adecuada a los pulmones.

Esta técnica puede utilizarse para administrar una gran cantidad de sustancias: desde suspensiones bacterianas, hasta soluciones de contraste, pasando por distintos tipos de fármacos. Es una vía de elección para la administración de sustancias escasamente solubles en los pulmones.

En la/s técnica/s clásica/s se utiliza/n entre otros materiales: laringoscopio, tubo endotraqueal, catéter y jeringa. En una variante de la técnica clásica es necesario un otoscopio pediátrico para ver la luz de la tráquea, y un catéter, después de haber sujetado la boca del animal con una banda elástica detrás de los incisivos para mantenerla bien abierta. En esta última técnica es necesaria la participación de dos personas y además corremos el riesgo de dañar boca e incisivos con la banda elástica.

La técnica que proponemos es una variante simplificada de la técnica clásica, en la que al ser ciega no es necesaria la utilización de tanto material. Además, reducimos al mínimo los riesgos de dañar la tráquea o cualquier otra estructura respiratoria, al utilizar

cánulas romas, con la longitud y el grosor adecuados para el acceso traqueal.

### MATERIAL NECESARIO

- Cánulas rígidas rectas de punta roma de acero inoxidable, 22G x25 mm, estériles.
- Pinzas de disección de punta fina serradas, 140 mm, estériles.
- Esparadrapo plástico Transpore™, 25 mm x9.
- Jeringas de 1 ml s/aguja.
- Lubricante oftalmológico.

### PREPARACIÓN DE LA ZONA DE TRABAJO

Colocar sobre la mesa de trabajo un papel de filtro (opcionalmente, puede colocarse encima un paño quirúrgico). Dejar un espacio libre de papel/paño quirúrgico para colocar la cabeza del ratón. Para realizar la técnica en ratones desnudos, es imprescindible realizarla en cabina de seguridad biológica.

### DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

1. Anestesiarnos al ratón por vía intraperitoneal (IP) con una combinación de Ketamina (100 mg/kg) y Xilacina (10 mg/kg). Lubricamos los ojos para proteger las córneas durante el período en el que el ratón esté anestesiado.
2. Una vez comprobado que el plano anestésico es el adecuado, verificando ausencia de reflejo podal, colocamos al ratón en

decúbito supino sobre el papel/paño quirúrgico, dejando la cabeza en el espacio libre de papel/paño quirúrgico. Al principio, si no se tiene destreza al realizar la técnica, recomendamos colocar una manta térmica bajo el animal, para mantener la temperatura corporal en condiciones adecuadas.

3. Con el esparadrapo sujetamos los bigotes y las orejas del ratón al espacio libre de papel/paño quirúrgico. En el caso de ratones *Athymic Nude*, sólo podremos sujetar las orejas. Prestar mucha atención de no cubrir con el esparadrapo las fosas nasales (ver Figura 1A).
4. Con la mano dominante, sujetamos la cánula y con la otra mano cogemos las pinzas. Con las pinzas sujetamos la lengua lateralmente, con la precaución de no apretar demasiado para no dañarla. Una vez retirada la lengua, introducimos la cánula en la boca del ratón, con la punta roma hacia arriba, con el fin de abordar la tráquea (ver Figuras 1B y 1C). Como sabemos, en la posición de decúbito supino, la tráquea es la estructura que queda más superficial en el cuello, y el esófago queda por debajo. Para asegurarnos que estamos entrando en la tráquea, hemos de sentir un *click* al atravesar la epiglotis. Una vez rebasada la epiglotis, seguimos introduciendo la cánula la distancia adecuada, que hemos calculado previamente, hasta llegar a la bifurcación bronquial (carina). En este punto inoculamos el contenido de la jeringa muy despacio.
5. Una vez inoculada la sustancia (ver Figura 1D), retiramos con cuidado la cánula, despegamos el esparadrapo, con cuidado de no arrancar los bigotes, y sujetamos al ratón en posición anatómica (erguida) para favorecer la distribución de la sustancia por gravedad. Si observamos que le cuesta respirar, realizaremos un masaje torácico. Si la lengua queda por fuera, con ayuda de las pinzas la introduciremos en la boca.
6. Una vez hemos comprobado que el ratón respira con normalidad, lo colocamos en su jaula en posición de decúbito lateral.
7. Mantenemos en observación durante una hora o hasta que se haya despertado por completo.

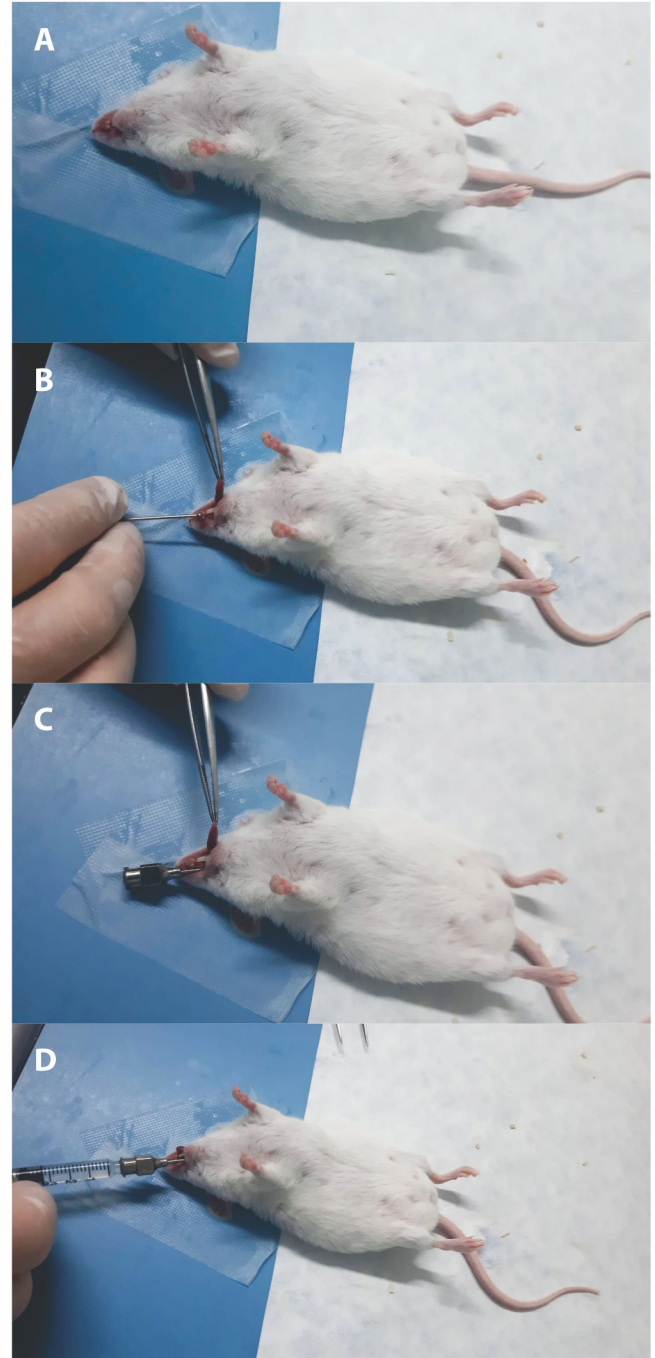


Imagen suministrada por la autoría

**Figura 1.-**Secuencia de realización de la técnica ciega de administración intratraqueal de sustancias en un ratón CD1. **A.** Sujeción del ratón con esparadrapo a la mesa de trabajo. **B.** Sujeción de la lengua lateralmente e inicio de introducción de la cánula en la boca del ratón. **C.** Cánula introducida hasta la bifurcación bronquial. **D.** Inoculación del contenido de la jeringa.

## PRECAUCIONES

La administración de sustancias en el sistema respiratorio puede producir reacciones adversas, por tanto, hemos de tener ciertas precauciones:

- Hay que evitar administrar sustancias irritantes.
- Es necesario controlar el pH de las sustancias a administrar.
- El volumen máximo a inocular en ratón no debería superar los 75-80 µl.
- Si en la sustancia a administrar hay presencia de sólidos, su tamaño debe ser tal que no obstruya las vías respiratorias, y no produzca irritación mecánica a su paso.

## VENTAJAS Y DESVENTAJAS

La ventaja de esta técnica es que se reduce el material necesario para realizarla al no ser imprescindible la utilización de laringoscopio, tubo endotraqueal, catéter, jeringa, ni otoscopio pediátrico.

Asimismo, tiene la ventaja de que aumenta la comodidad en la ejecución del procedimiento, tanto para el técnico, como para el animal y la puede realizar un técnico solo.

La única desventaja de la técnica es que requiere de entrenamiento y experiencia para que la posibilidad de inocular en esófago se minimice.

## CONCLUSIONES

Esta técnica ciega de administración por vía intratraqueal supone una mejora en la administración de la dosis exacta de sustancia a nivel pulmonar, así como en la optimización de los recursos.

Es una técnica segura, minimizando al máximo el riesgo de dañar el tracto respiratorio.

También esta técnica supone la aplicación de las 3Rs, en este caso la R de refinamiento, puesto que el único estrés al que se somete al animal es la inmovilización para la administración de la anestesia, realizándose el resto de la técnica con el animal anestesiado. Además, si la técnica se realiza de forma correcta, al despertar el animal no notará ningún tipo de efecto secundario debido a la técnica de administración en sí.

## BIBLIOGRAFÍA

- Jesús Martín, Josep Antoni Tur Marí, y José María Orellana Muriana. *Ciencia y tecnología del animal de laboratorio*. Universidad de Alcalá. 2008.
- Morton DB, Jennings M, Buckewll A, et al. *Refining procedures for the administration of substances*. *Laboratory Animals*. 2001;35:1-41.
- Helms MN, Torres-Gonzalez E, Goodson P, et al. *Direct Tracheal Instillation of Solutes into Mouse Lung*. *J Vis Exp*. 2010;42:1941



En nuestro animalario,  
**primero**  
**el bienestar**  
**animal**



sociedad española  
para las ciencias  
del animal de laboratorio

[www.secal.es](http://www.secal.es)

## Riesgos laborales asociados al humo quirúrgico

Jesús Martínez Palacio y Jesús Martínez García  
CIEMAT – Servicio de Animalario

**Palabras clave:** electrocirugía, partículas, EPIs.

### INTRODUCCIÓN

La COVID-19 ha obligado a reconsiderar los riesgos asociados al humo quirúrgico, que no son solo los asociados a agentes biológicos infecciosos. En este artículo hacemos un pequeño repaso de los principales riesgos asociados al mismo.

El humo quirúrgico es un conjunto de elementos químicos y partículas suspendidas en el aire procedente de la destrucción térmica de tejidos, mediante el uso de distintos instrumentos quirúrgicos: ultrasónicos, láser, electro-cauterios (ver Figura 1), electro-coaguladores, bisturí quirúrgico eléctrico... Entre sus componentes se incluyen productos químicos volátiles, productos asociados a la pirolisis de tejidos o partículas sólidas y líquidas en suspensión que pueden contener organismos biológicos viables.

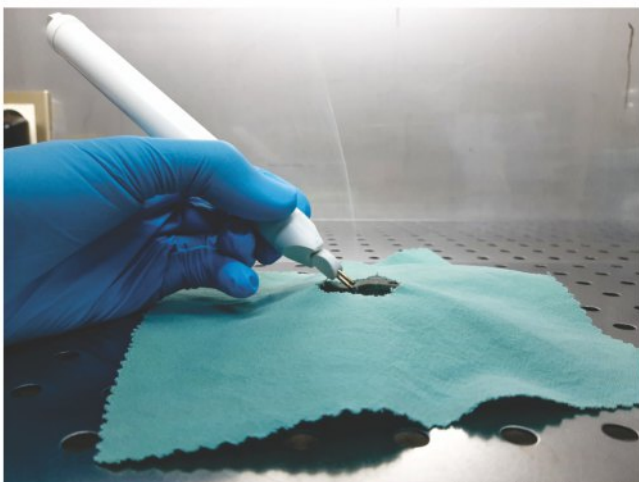


Imagen suministrada por la autoría

**Figura 1.-** Humo quirúrgico generado por un cauterio eléctrico. Fotografía cedida por la autoría.

En este breve artículo expondremos los riesgos asociados a cada uno de estos elementos y unas ideas o normas básicas para la prevención de los mismos. Los principales factores que afectan a

la exposición a estos humos dependen de los parámetros eléctricos del equipo (potencia, intensidad de corriente, frecuencia), al tipo de procedimiento aplicado (tipo de electrodo, uso, tipo de láser), modo de funcionamiento (continuo, pulsado...), tipo de tejido que se trate (grasa, músculo, otros órganos...) y, evidentemente, de las características propias del quirófano (volumen, ventilación...). Aparte de los riesgos que describimos a continuación, existe un factor 'extra', el olor generado por la pirolisis (chamuscado) de los tejidos. Este olor desagradable puede resultar en estrés o rechazo para algunas personas.

Una revisión de los artículos indexados (MEDLINE en PubMed) utilizando diferentes combinaciones de las palabras clave: humo quirúrgico, dermatología, mascarilla quirúrgica, respirador, evacuador de humo y directrices; generó datos de 45 artículos de literatura sobre dermatología, cirugía, enfermedades infecciosas, obstetricia y biología del cáncer. Esto evidencia la realidad de este riesgo, cuyo análisis detectó que aunque algunos dermatólogos lo conocen, son pocos los que emplean medidas preventivas.

### AGENTES BIOLÓGICOS

Como ya se ha indicado, el humo quirúrgico puede contener partículas sólidas y líquidas en las que pueden vehicularse agentes biológicos activos (células, fragmentos celulares, virus...). Esta es una preocupación actual por las circunstancias derivadas de la COVID-19 (aunque no se ha demostrado el contagio por esta vía). El VIH también fue una grave preocupación pero hasta el momento no existen evidencias de esta vía de infección. Sin embargo, si se han descrito estos riesgos/efectos/contagios en otros campos de la medicina.

Existe evidencia del contagio del virus del papiloma humano en ginecólogos y personal de enfermería asociado al humo quirúrgico. Se ha observado una elevada incidencia de verrugas nasofaríngeas en cirujanos que trabajan con el láser de CO<sub>2</sub>. En cirujanos que emplean el láser de Yag-Neodimio, se demostró

# SEGURIDAD EN 5'

que contrajeron papilomatosis laríngea tras tratar lesiones de este tipo con ese láser.

## OTROS CONTAMINANTES

Diversos estudios demuestran la presencia de distintos contaminantes en el humo quirúrgico. Un artículo que analizaba muestras de gas mediante cromatografía y espectrometría de masas, obtenidas tras el uso de electrocauterios en cirugías abdominales, demostró la presencia de 18 compuestos volátiles diferentes. Cinco de los compuestos cancerígenos detectados mostraban un incremento en el riesgo de cáncer mayor que insignificante, clasificándose como inaceptable el riesgo para el 1,2-dicloroetano y el benceno.

Igualmente, hay un artículo que concluye que el monóxido de carbono del humo quirúrgico puede dar lugar a fibrosis pulmonar.

## MEDIDAS DE PREVENCIÓN

Siguiendo el modelo clásico de Prevención de Riesgos Laborales (protección colectiva antes que individual + eliminar riesgos en origen) aplicado al riesgo derivado del humo quirúrgico que hoy comentamos, recomendamos las siguientes medidas:

- Favorecer la correcta ventilación de los locales en que se realicen las operaciones de riesgo.
- Distanciarse de los puntos de generación del humo. Esta parte es difícil en casos de microcirugías, en que estamos literalmente sobre el animal.
- Instalar aspiradores localizados de gases para retirar el humo generado en la cirugía. No son comunes, pero la crisis de la COVID-19 los ha potenciado bastante en los quirófanos de humana.

Estas medidas pueden ser útiles tanto en caso de contaminantes químicos como biológicos. Si se implementan, puede no ser necesario llegar al uso de equipos de protección individual (EPIs) para afrontar los riesgos específicos:

- Uso de protección respiratoria FFP2 y gafas de seguridad para la prevención de riesgos biológicos.
- Uso de medias máscaras con filtro de vapores orgánicos para la prevención de riesgos químicos. Suelen ser 'armatostes' cuyo uso es difícil de compatibilizar en quirófano (ver Figura 2A).

- Uso de mascarillas con carbón activado (ver Figura 2B) para minimizar olores desagradables y reducir la exposición a algunos volátiles (no se consideran EPIs, son similares a mascarillas quirúrgicas clásicas que incluyen carbón activo en la malla de filtro).

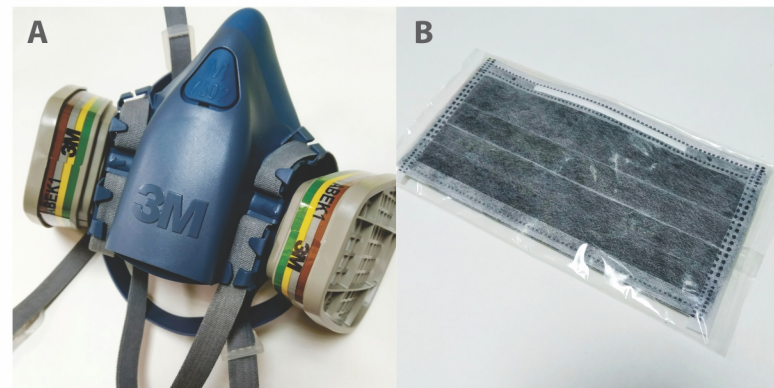


Imagen suministrada por la autoría

**Figura 2.- A.** Máscara de seguridad para químicos. **B.** Mascarilla tipo quirófano con carbón activo. Fotografía cedida por la autoría.

## CONCLUSIONES

Aunque el humo quirúrgico no es un peligro grave para la salud, si deben conocerse sus riesgos. El personal que utiliza instrumentos quirúrgicos que generen este humo debe conocer los riesgos potenciales para la salud a largo plazo asociados con la exposición al mismo.

Aplicar medidas de reducción de la exposición o el uso de EPIs en caso de no poderse aplicar estas serían aconsejables.

Los reconocimientos médicos periódicos del personal de quirófano deberían considerar estos riesgos.

## PARA SABER MÁS

- [https://www.diariomedico.com/medicina/cirugia-general/autocuidado/el-humo-quirurgico-un-riesgo-para-la-salud-que-no-hay-que-pasar-por-alto.html?emk=NPSMED1&s\\_kw=1T](https://www.diariomedico.com/medicina/cirugia-general/autocuidado/el-humo-quirurgico-un-riesgo-para-la-salud-que-no-hay-que-pasar-por-alto.html?emk=NPSMED1&s_kw=1T)
- <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0190962218320619>
- <https://link.springer.com/article/10.1007/s00464-014-3472-3>
- [https://prevencion.umh.es/files/2012/04/2-surgical\\_smoke.pdf](https://prevencion.umh.es/files/2012/04/2-surgical_smoke.pdf)

## Validación de procesos de esterilización con autoclave y de desinfección de alto nivel mediante generadores de vapor de peróxido de hidrógeno

Rafael García, Concepción Mariscal, Rubén Díaz, Cristina Muñoz, Ángeles Talavante,  
John Sparrowe y Magdalena Jiménez  
GlaxoSmithKline I+D DDW-IVSD

**Palabras clave:** autoclave, testigo, desinfección.

### INTRODUCCIÓN

En GSK I+D España trabajamos en la búsqueda de nuevos tratamientos frente a enfermedades de países en desarrollo (malaria, tuberculosis y enfermedades entéricas). Estas enfermedades están causadas por agentes biológicos clase 3\* y 3. El trabajo *in vivo* se lleva a cabo en animalarios de contención biológica de nivel 3 (ANCB3) y todo el material usado sale de la zona ANCB3 en contenedores de seguridad biológica y a través de autoclave. Para evitar la posible diseminación de los agentes biológicos debemos verificar la correcta esterilización de los materiales antes de procesarlos y eliminarlos. Además, el material que utilizamos, cubetas, biberones, lechos y material de enriquecimiento, requiere estar estéril antes de su uso porque se trabaja con ratones inmunodeficientes.

Por último, desinfectamos los cubículos donde realizamos los ensayos, al finalizar cada batería de experimentos, mediante generadores de vapor de peróxido de hidrógeno (VHP).

Por lo tanto, debemos asegurar la correcta esterilización de los distintos materiales usados en el alojamiento de los animales de nuestra instalación, tanto a la entrada como a la salida, así como la desinfección de las instalaciones. Para ello utilizamos autoclaves de vapor y generadores VHP, y verificamos el correcto funcionamiento de cada ciclo mediante diferentes tipos de testigos e indicadores (integradores químicos y testigos biológicos; ver Figura 1).



Imagen suministrada por la autoría

**Figura 1.-** Testigos utilizados en el material a esterilizar. De izquierda a derecha: integrador químico de vapor, ComplySteriGage®; testigo biológico para sólidos, Attest®; testigo biológico para líquidos, Sterikon®; test de vacío, Dart®; testigo químico de vapor, cinta indicadora de autoclave; testigo químico colorimétrico de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, VHP indicator®; y testigo biológico para ciclos de VHP, Spordex®.

### TESTIGOS UTILIZADOS EN LOS AUTOCLAVES

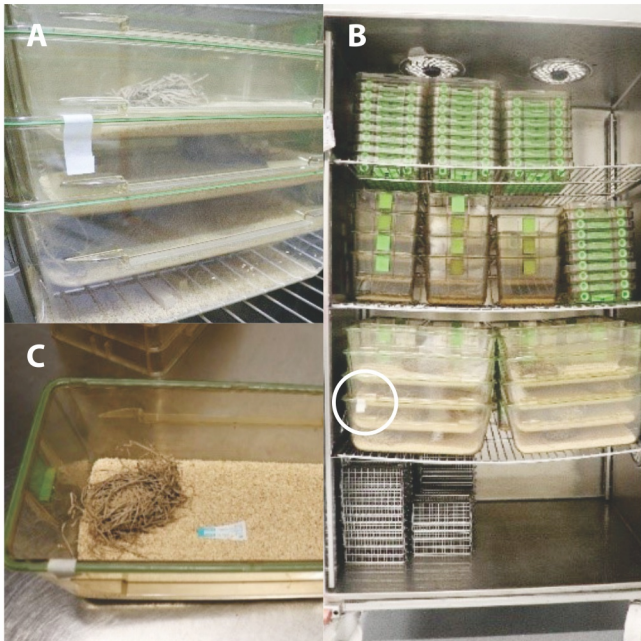
#### Integrador químico de vapor (3M, ComplySteriGage®)

Este testigo integra el efecto de la temperatura y el tiempo de exposición del ciclo de esterilización, que se plasma en la migración de un producto químico a lo largo de una escala lineal de fácil lectura.

Se coloca un testigo en el exterior de uno de los carros contenedores en cada ciclo de autoclavado y otro en el interior de cada uno de ellos, dentro de una de las cubetas, entre la viruta

# AL CUIDADO

(ver Figuras 2B y 2C) para asegurar la llegada de vapor hasta él. Para marcar la cubeta que contiene el testigo, se coloca un trozo de cinta indicadora de autoclave (ver Figura 2A). La lectura de ambos testigos es inmediata tras el ciclo de esterilización.



**Figura 2.-** A. Detalle de cubetas apiladas, señalada la que contiene el testigo; se busca confirmar que se llega a la temperatura y tiempo adecuados en los puntos más difíciles de esterilizar. B. Carro contenedor de autoclave con integrador químico. C. Detalle de la cubeta con el testigo. En un caso real el testigo está oculto, enterrado entre la viruta.

El integrador químico de vapor tiene 2 zonas claramente diferenciadas; la primera de inicio y la segunda de seguridad; si la banda gris cubre toda la zona de inicio y, además, parcial o totalmente la zona de seguridad, el ciclo se considerará satisfactorio (ver Figura 3).



**Figura 3.-** Integrador químico de vapor control y 2 testigos procesados, uno de manera no satisfactoria (en medio), donde se ve que la banda gris no llega a la zona de seguridad, y el otro donde se cubren las dos zonas (a bajo).

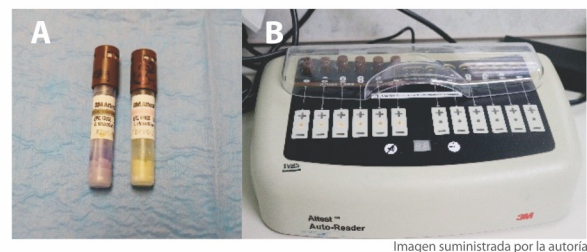
## Testigo biológico para sólidos (3M, Attest® 1292E)

Se trata de un vial con medio de cultivo y esporas de *Geobacillus stearothermophilus*. Semanalmente, se coloca un testigo en uno de los carros contenedores, tanto con el material de entrada como con el de salida. En el caso de los residuos de las habitaciones donde se trabaja con *Mycobacterium tuberculosis*, el material se debe contener dentro de unas bolsas selladas de policloruro de vinilo (PVC) y los testigos se usan en cada carro contenedor (ver Figuras 4A y 4B).



**Figura 4.-** A. Carro contenedor de autoclave con material de tuberculosis contenido en bolsas selladas. B. Detalle de una cubeta con *M. tuberculosis* con testigo.

Para comprobar si el ciclo se ha completado correctamente, el testigo autoclavado se introduce, junto a un control positivo, en el lector automático 290 3M Attest® (ver Figura 5B). Este equipo detecta la fluorescencia del cultivo e indica si es positivo o negativo en la pantalla frontal del equipo. En el caso que el ciclo de autoclave haya sido satisfactorio al cabo de 3 horas el lector automático emite un símbolo negativo verde; en el caso que el ciclo haya resultado erróneo, se emite un símbolo positivo rojo además de una alarma audible. El lector automático permite una lectura temprana, antes de producirse el viraje de color azulado a amarillo (ver Figura 5A).



**Figura 5.-** A. Testigo biológico para sólidos control y virado. B. Lector de testigos biológicos Attest®.

## Testigo biológico para líquidos (Merck, Sterikon®)

Consiste en una ampolla con un medio de crecimiento, azúcar, un indicador de pH y esporas de *Geobacillus stearothermophilus* (ver Figura 6A). A temperaturas por debajo de 121°C, o tiempos de exposición menores a 15 minutos, las esporas sobreviven y el testigo cambia de color al incubarlo durante 48 horas. Estos testigos los usamos en biberones usados en cubículos dedicados a *Salmonelosis* y *M. Tuberculosis*, estos últimos contenidos en bolsas de PVC selladas (ver Figura 6B), al igual que el resto de material procedente de estas habitaciones. Para autoclavar los líquidos, los metemos dentro de contenedores de contención biológica debidamente señalizados (ver Figuras 6C y 6D).

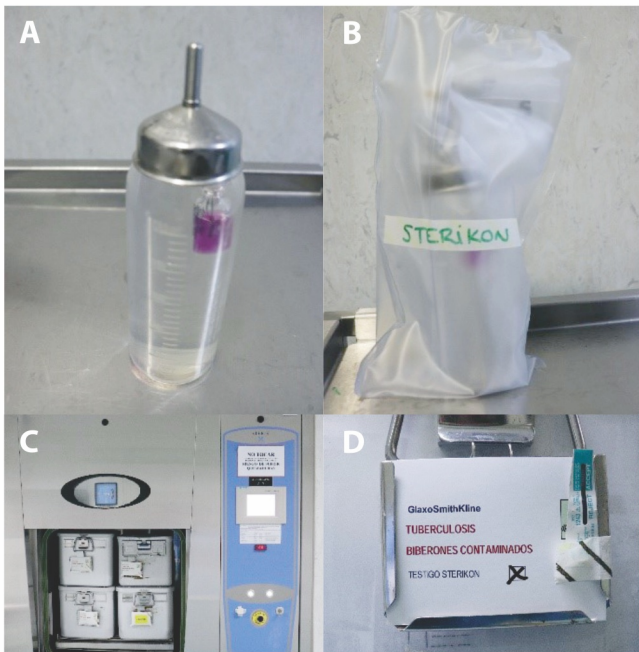


Imagen suministrada por la autoría

**Figura 6.-** A. Biberón con testigo Sterikon®. B. Biberón preparado y con testigo para procesar en autoclave dentro de bolsa de PVC sellada. C. Contenedores cargados en el autoclave. D. Detalle de un contenedor marcado con el testigo en su interior.

Para procesar los testigos Sterikon® se incuban a 55°C durante 48 horas. Pasado ese tiempo el testigo vira de rosa a amarillo en el caso que el ciclo haya sido satisfactorio (ver Figura 7).

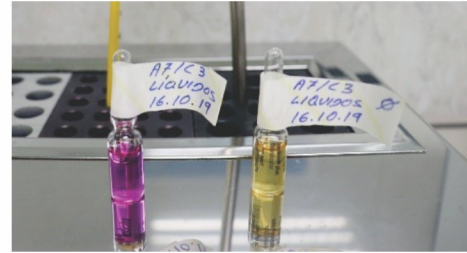


Imagen suministrada por la autoría

**Figura 7.-** Testigo Sterikon® control (izquierda) y virado (derecha) después de 48 horas de incubación.

Ningún material, ya sean biberones o cualquier otro, se usa, procesa o elimina hasta que no se confirma que el resultado del ciclo de esterilización es efectivo. En caso de no ser correcto, el ciclo de autoclave vuelve a repetirse con testigos nuevos.

## Indicador de vacío (Steris, Dart®)

Además de testigos químicos y biológicos, también utilizamos un indicador de vacío para verificar mensualmente la eficacia en la eliminación del aire previo a su sustitución por vapor en el autoclave (ver Figuras 8A y 8B). Se utiliza para verificar los procesos tanto en ciclos de entrada como de salida de material.

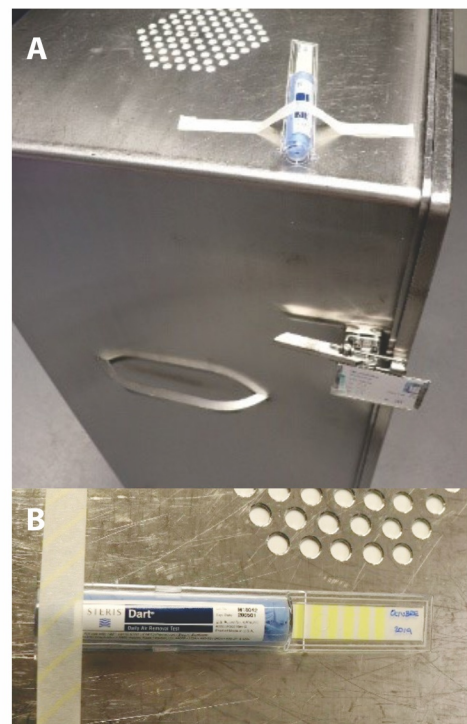


Imagen suministrada por la autoría

**Figura 8.-** A. Carro contenedor con indicador de vacío. B. Detalle de indicador de vacío.

# AL CUIDADO

La lectura es inmediata, observando el virado de 6 bandas, de color amarillo hacia negro (ver Figura 9), en el caso que alguna de las bandas no vire totalmente a color negro el resultado no se considera satisfactorio.



Imagen suministrada por la autoría

**Figura 9.-** Test de vacío Dart® con resultado satisfactorio (arriba) y un testigo sin usar (abajo).

## TESTIGOS UTILIZADOS CON LOS GENERADORES DE VHP

### Testigo químico colorimétrico (Steris, VHP Indicator®)

Las tiras químicas se sitúan detrás del cristal de la puerta de la habitación que da al pasillo (ver Figuras 10A y 10B), lo que nos permite observar que el testigo ha virado de color sin necesidad de entrar a la habitación, al tiempo que permitimos que el testigo entre en contacto con el VHP.



Imagen suministrada por la autoría

**Figura 10.-A.** Habitación preparada para ser desinfectada con generador de VHP donde puede apreciarse el testigo químico colorimétrico. **B.** Detalle del cristal de la puerta con la tira química.

En el caso de los ciclos de VHP, los primeros indicadores que leemos son los testigos químicos colorimétricos, en los que la parte indicadora cambia de color rosa a amarillo, de modo que ya nos hace ver que durante el ciclo se ha inyectado al cubículo una determinada cantidad de peróxido de hidrógeno. Tras exponerse

a una concentración alta de peróxido, la parte indicadora vira de color rosa a amarillo. Tanto durante el ciclo de descontaminación como al finalizar, se pueden comprobar visualmente de manera inmediata (ver Figura 11).

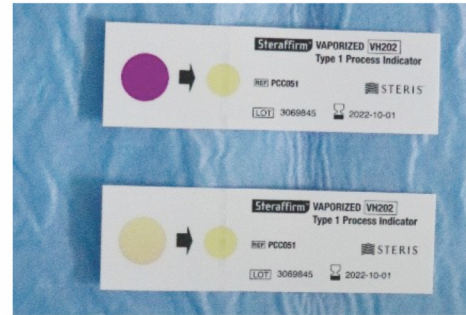


Imagen suministrada por la autoría

**Figura 11.-**Detalle de 2 VHP Indicator®, el primero después de un ciclo de VHP y el segundo, antes de usarse.

### Testigos biológicos (Steris, Spordex®)

Son discos de material absorbente inoculados con esporas de *Geobacillus stearothermophilus* e introducidos en sobres permeables al VHP. Cada vez que se realiza un ciclo de descontaminación en los cubículos del ANCB3 se colocan varios testigos repartidos por la habitación y la prehabitación (ver Figuras 12A y 12B), de modo que permiten comprobar que se ha alcanzado la concentración de peróxido suficiente y durante el tiempo necesario para acabar con los posibles agentes infecciosos existentes.

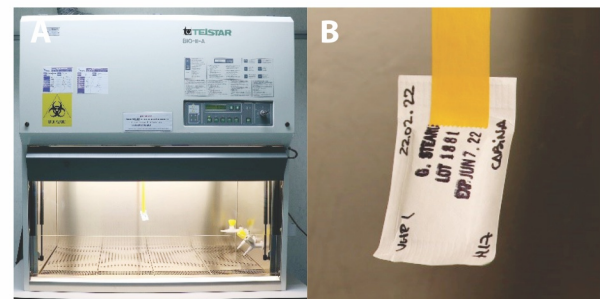


Imagen suministrada por la autoría

**Figura 12.-A.** Habitación preparada para la desinfección con VHP; en el interior de la cabina puede observarse un Spordex®. **B.** Detalle del testigo biológico preparado para el ciclo de desinfección.

Terminado el ciclo de VHP los testigos se procesan en el laboratorio y se incuban en medio Soja-Triptona (TSB) un mínimo de 48 horas a una temperatura de 55-60°C. Si el medio de cultivo

se mantiene totalmente transparente y no se enturbia, podemos afirmar que el ciclo ha sido satisfactorio (ver Figura 13).

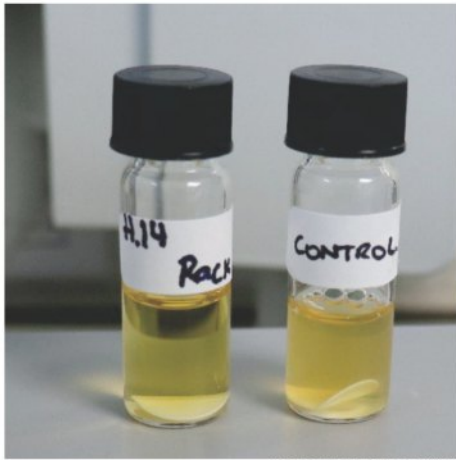


Imagen suministrada por la autoría

**Figura 13.**-Detalle de 2 viales conteniendo los testigos Spordex® sembrados en TSB, el primero después de haber pasado por un ciclo de VHP satisfactorio y el segundo un testigo control.

Además de los testigos, los propios equipos tienen un control interno que se asegura de que cada ciclo ha cumplido con los parámetros establecidos y ante cualquier variación o incumplimiento, el equipo aborta el ciclo. Adicionalmente, y para asegurar el buen funcionamiento, tanto de los autoclaves como de los generadores VHP, la casa comercial (Steris®) realiza una revisión de todos los equipos semestralmente.

## CONCLUSIONES

En una instalación de bioseguridad es fundamental tener procedimientos adecuados de esterilización y desinfección y asegurar que estos procedimientos se realizan correctamente. Los diversos testigos específicos utilizados en nuestras instalaciones nos permiten garantizar el correcto control de la esterilización del material limpio para uso con animales y también del material contaminado para la protección de los trabajadores y de la comunidad.



Más de 400 socios  
relacionados con el sector  
de los animalarios

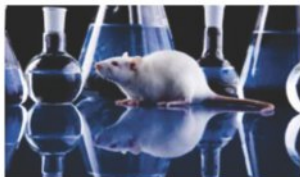
Anúnciate  
en nuestra  
revista

publicidad.revista@secal.es

C/ Laguna del Marquesado 14, Nave 1  
 28021 MADRID  
 Teléfono: 91 710 95 47 /Fax: 91 796 65 52  
 E-mail: [steriltech@steriltech.net](mailto:steriltech@steriltech.net)  
[www.steriltech.net](http://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.



[bmt@bmtiberia.es](mailto:bmt@bmtiberia.es)  
[www.bmtiberia.es](http://www.bmtiberia.es)

**Esterilizadores de vapor adaptados a sus necesidades**



## El estrés se representa en rojo, pero... lo paga "la blanca"

**Rafael Alayón-Afonso y Carlos José Martel-Benítez**

*División de Enfermedades Infecciosas e Ictiopatología, Instituto Universitario de Salud Animal y Seguridad Alimentaria (IUSA), Universidad de las Palmas de Gran Canaria*

**Palabras clave:** felino, aclimatación, hemograma.

Los calicivirus felinos (FCV) son miembros de la familia Caliciviridae (género Vesivirus) y un importante patógeno que afecta a gatos en todo el mundo. Tanto es así, que los principales agentes etiológicos relacionados con enfermedades respiratorias en gatos son el herpes virus felino tipo 1 y el calicivirus felino, sobre todo en las colonias felinas que no siguen un plan de medicina preventiva.

Un grupo de investigadores en sanidad animal se propuso reducir los problemas asociados a esta patología mediante el uso de vacunas a partir de un vector viral, una nueva estrategia inmunológica prometedora para el futuro de la medicina humana y animal.

El vector que usaron fue un lentivirus perteneciente a la familia *Retroviridae*, donde únicamente se mantuvieron dos pasos del ciclo de vida retroviral: la transcripción inversa y la integración; ya que son fundamentales para el funcionamiento de los vectores lentivirales.

Para ello se utilizaron un vector lentiviral de tercera generación que se compone de dos plásmidos de empaquetamiento separados, uno que codifica para el gen gag y pol, y otro que codifica para el gen rev, lo que hace más improbable la generación de virus recombinantes. Un plásmido adicional codifica la proteína de la envoltura "env", derivada del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) que reconoce un receptor de expresión ubicua que ha sido identificado recientemente como el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL). El plásmido que codifica el gen de interés, contiene secuencias de repetición terminal larga (LTR) lentivirales que fueron alteradas para que se autoinactiven (SIN) evitando así la recombinación.

En el plásmido que codifica el material genético de interés, usaron genes que expresan proteínas antigénicas del calicivirus 255 por

las células del sistema inmune del huésped. Este virus tiene gran capacidad de mutación existiendo un gran número de cepas diferentes de FCV, pero todas ellas poseen reactividad cruzada para clasificarse dentro de un mismo serotipo.

Para este estudio se planificó una muestra de 60 gatos machos de 6 a 9 meses de vida susceptibles a la infección por FCV, divididos en tres grupos:

- Grupo vacunado control (n=20) al que se le inoculó el vector viral y no se expuso al FCV.
- Grupo no vacunado y expuesto a FCV (n=20) al que no se le inoculó el vector viral y se expuso al FCV.
- Grupo vacunado y expuesto a FCV (n=20) al que se le inoculó el vector viral y se expuso al FCV.

Pasados 21 días desde la vacunación, se exponía al FCV a los animales de los dos últimos grupos.

Los gatos pertenecientes a los grupos "vacunado control" y "vacunado expuesto a FCV" llegaron a las instalaciones 30 días antes del comienzo del ensayo. Tras guardar cuarentena de 10 días, se procedió durante 10 días a un entrenamiento que consistió en simular el manejo de extracción sanguínea, por parte de las personas responsables de dicho procedimiento en el grupo investigador. Por razones de logística en el transporte, los últimos animales en llegar a las instalaciones fueron los gatos del grupo "no vacunado y expuesto a FCV", que llegaron a las instalaciones 15 días antes del comienzo del ensayo. Igualmente, se procedió a guardar el mismo tiempo de cuarentena, pero tan sólo 3 días de entrenamiento.

La muestra de sangre fue extraída de la vena cefálica de todos los animales a: tiempo 0 (previo a la vacunación con el vector), tiempo

# ¿Y TÚ QUÉ OPINAS?

7 (siete días tras la vacunación con el vector), tiempo 14 (catorce días tras la vacunación con el vector) y tiempo 21 (veintiún días tras la vacunación con el vector).

De manera inesperada, los resultados de los hemogramas de control de las muestras sanguíneas a tiempo 0, ofrecieron alteraciones de la serie blanca (ver Figura 1) en el grupo “no vacunado expuesto a FCV”. Consistía en un marcado incremento en el número de neutrófilos (neutrofilia), así como una ligera monocitosis acompañada de un moderado descenso en el número de eosinófilos y linfocitos; con lo que se decide parar el estudio.



Imagen suministrada por la autoría

**Figura 1.-**Serie Blanca. Imagen subministrada por la autoría: Miguel Martín Betancor.

**¿Y tú, qué opinas?**

**¿Qué crees que puede haber influenciado esta alteración en la serie blanca?**

**¿Puede influenciar la administración del vector en este cambio?**

En este caso, observando todo el procedimiento realizado por el grupo investigador y buscando en la bibliografía, encontramos una posible respuesta al problema.

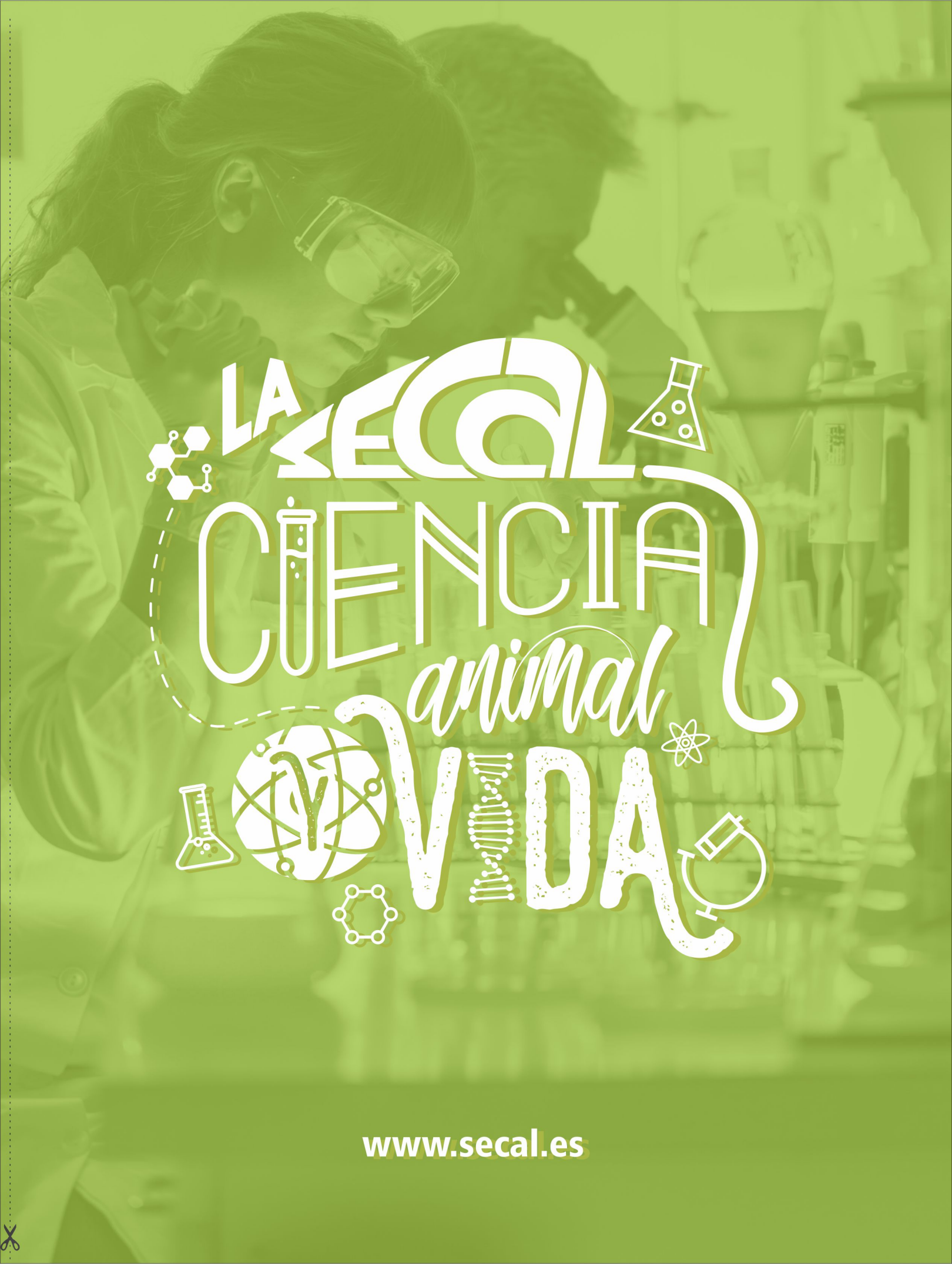
Llevando a cabo los primeros pasos del estudio, el grupo investigador discute sobre las diferencias en los tiempos de adaptación de los animales. Se observa una diferencia destacable entre el grupo “no vacunado expuesto” con 3 días de entrenamiento, y los grupos “vacunados expuestos” y “vacunados no expuestos” con 10 días de entrenamiento. En relación con lo anterior, en la bibliografía se encuentra bien documentado lo que se conoce como leucograma de estrés, al que los felinos son especialmente susceptibles. Esta alteración de la serie blanca está caracterizada por una marcada neutrofilia acompañada de monocitosis y de una ligera linfopenia y eosinopenia, en respuesta a la producción de corticoides endógenos.

Esto hace que consideremos muy importante destinar tiempo suficiente a la aclimatación, familiarización con el entorno, con los técnicos y con el personal que va a realizar los procedimientos. De esta forma, ganaremos en tiempo, en calidad de nuestros resultados y, sobre todo, en bienestar animal.

Evidentemente, la última pregunta relacionada con el potencial papel del vector viral en estos resultados, no tiene sentido plantearla. En el momento de la extracción de sangre (tiempo 0) ninguno de los gatos estaba vacunado.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bergmann M, Ballin A, Schulz B, et al. *Treatment of acute viral feline upper respiratory tract infections*. Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere. 2019;47(2):98-109.
- Fumian TM, Tuipulotu DE, Netzler NE, et al. *Potential Therapeutic Agents for Feline Calicivirus Infection*. Viruses. 2018;10(8):433.
- Milone MC and O'Doherty U. *Clinical use of antiviral vectors*. Leukemia, Nature Publishing Group UK. 2018;32(7):1529-1541.
- Reagan WJ, Sanders TG, and De Nicofa DB. *Hematología veterinaria. Atlas de especies domésticas comunes*. Editado por Reagan WJ, Sanders TG, DeNicofa DB. Barcelona (España): Ediciones S, 1999. ISBN 978-84-87736-25-4.
- Valli, VEO. *The hematopoietic system*. In: EnJubb KVF Kennedy, P.C., Palmer, N., (dir), Pathology of domestic animals. Volume 3. 4ª ed. London (UK): Academic Press, Inc, 1993, ISBN 0-12-391607-0.



LA **SECA**

CIENCIA

*animal*

**VIDA**

The graphic features the text 'LA SECA' at the top, 'CIENCIA' in the middle, and 'VIDA' at the bottom, with 'animal' written in a cursive script between 'CIENCIA' and 'VIDA'. The text is surrounded by various scientific icons: a molecular structure, a flask, a globe, a DNA helix, a microscope, and a beaker. A dashed line connects the molecular structure to the globe.

[www.secal.es](http://www.secal.es)



# Las Seis Cs en la Cultura del Cuidado

Anna Vilà; Hernán Serna, BINAEX

annavila@binaex.com hserna@binaex.com

## INTRODUCCIÓN

La **Cultura del Cuidado** (CdC) es un término que cada vez se menciona más dentro del ámbito de la experimentación científica. Algunos centros de investigación ya están trabajando diferentes programas para su implementación. Este trabajo pretende dar valor a una nueva metodología basada en el concepto de **las Seis Cs** dentro del marco de una efectiva CdC. La ejecución de este método parte de la necesidad de poder garantizar que la CdC está presente en la mejora continua del cuidado y bienestar de los animales, del bienestar del personal, la calidad científica y la transparencia en la experimentación.

## METODOLOGÍA

La metodología en la aplicación de la cultura del cuidado del centro:

BINAEX ofrece un servicio de asesoramiento en la implementación de la CdC que proporciona un sello de garantía de calidad en todos los ámbitos que define la CdC en las 6 Cs anteriormente descritas. En términos generales se basa en:



## EJEMPLOS PARA LA APLICACIÓN DE LAS 6 Cs

<b>Compromiso</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Adhesión al Acuerdo de Transparencia sobre el uso de animales en experimentación científica</li> <li>Establecer una declaración institucional sólida con respecto a su compromiso con el bienestar animal en forma de tarjeta.</li> </ul>
<b>Comunicación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Desarrollar canales proactivos y eficaces de comunicación entre los investigadores, el personal encargado del cuidado de los animales y veterinarios en beneficio mutuo de la ciencia y el bienestar animal.</li> </ul>
<b>Competencia</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Establecer un programa de supervisión para el personal cuando hace más de un año que no realiza la experimental (obtención de sangre, administración...etc.)</li> <li>Establecer un calendario anual de formación continuada del personal para cada una de las funciones.</li> </ul>
<b>Cumplimiento</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Establecer unos procedimientos normalizados de trabajo y unas políticas de bienestar animal.</li> <li>Formación de seguridad laboral según la especie y el área la cual va a trabajar.</li> </ul>
<b>Cuidado</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Formación de la gestión emocional. Gestión de la carga de trabajo/tiempo.</li> <li>El OEBA y el responsable del estabulario deben participar en la formación para establecer un protocolo de incidencias emocionales que pueden afectar al estudio y a los animales.</li> </ul>
<b>Conducta</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>La participación del personal en los congresos o en actividades para difundir las 3 Erres.</li> <li>La promoción de herramientas o cápsulas educativas para un mejor cuidado de los animales y el bienestar del personal.</li> </ul>

## CONCLUSIÓN

Englobar este concepto, las 6 Cs, y proporcionar una perspectiva integrada de la CdC como una nueva metodología, permitirá y facilitará la implementación y desarrollo de un programa para CdC en un centro de investigación.

## REFERENCIAS

- H. J. Klein and K. A. Bayne. Establishing a Culture of Care, Conscience, and Responsibility: Addressing the Improvement of Scientific Discovery and Animal Welfare Through Science-based Performance Standards. ILAR Journal, Volume 48, Issue 1, 2007, Pages 3-11. <https://doi.org/10.1093/ilar.48.1.3>
- Sally Robinson, Sue Sparrow, Bella Williams, Thierry Decelle, Thomas Bertelsen, Kirsty Reid, Magda Chlebub. (2019) The European Federation of the pharmaceutical industry and Associations Research and Animal Welfare Group: Assessing and benchmarking "Culture of care" in context of using animals for scientific purpose. Laboratory Animals. <https://www.efpia.eu/publications/downloads/efpia/assessing-and-benchmarking-culture-of-care-in-the-context-of-using-animals-for-scientific-purpose/>
- Nathalie Nuyts & Carrie Friese. (2021) Communicative patterns and social networks between scientists and technicians in a culture of care: discussing morality across a hierarchy of occupational spaces. Social and Cultural Geography <http://eprints.ise.ac.uk/108472/2/>
- Communicative patterns and social networks between scientists and technicians in a culture of care: discussing morality across a hierarchy of occupational spaces. Social and Cultural Geography <http://eprints.ise.ac.uk/108472/2/>
- Angela Kerton and Jordi L. Tremoleda. (2021) Emotional challenges in our work with laboratory animals: tools that support caring for others and yourself. Animal technology and welfare.
- Jordi L. Tremoleda and Angela. (2021) Teaching a culture of care: why it matters. Rev Bio y Der 51:43-60. <https://revistes.ub.edu/index.php/RBD/article/view/31130/33181>
- Javier Guillen and Gary L. Borkowski. (2020) Evaluation of Ethical Review and Oversight Processes by AAALAC International. Journal of Applied Animal Ethics Research 129-150.
- Megan R. LaFollette, Megan C. Riley, Sylvie Cloutier, Colleen M. Brady, Marguerite E. O'Haire and Brianna N. Gaskill. (2020) Laboratory Animal Welfare Meets Human Welfare: A Cross-Sectional Study of Professional Quality of Life, Including Compassion Fatigue in Laboratory Animal Personnel. Frontiers in Veterinary Science <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7066073/>

## 1 COMPROMISO

La **C de Compromiso** es la más importante, en la cual el centro debe tomar la iniciativa de dar visibilidad a su responsabilidad, profesionalidad y transparencia en la gestión de la CdC. De alguna manera esta C funciona como el centro diagnóstico de los logros alcanzados en todas las C, basada en el gran desafío de implementar una efectiva CdC.

## 2 COMUNICACIÓN

Esta C va de **Comunicación** proactiva, la cual debe establecerse a todos los niveles del centro. El Órgano Encargado del Bienestar de los Animales (OEBA) es el responsable de implementar estos canales de comunicación.

## 3 COMPETENCIA

La **C de Competencia** abarca el área de formación del personal, así como determina las competencias de cada persona que trabaja con los animales, para conocer sus responsabilidades y habilidades en el desempeño de sus funciones con la máxima integridad.

## 4 CUMPLIMIENTO

La **C de Cumplimiento** se le asocia todas las normativas y recomendaciones que hay en el entorno de la experimentación científica, ya que son la clave para el uso, manejo y cuidado de los animales.

## 5 CUIDADO

La **C de Cuidado** es la más emocional, donde los conceptos de cuidado no solo están presentes en los animales sino que también debemos centrarnos en el bienestar emocional del personal que los cuida. La responsabilidad del cuidado, se deriva a través de la compasión, el afecto y el respeto.

## 6 CONDUCTA

La **C de Conducta** remarca la actitud que debe tener el personal que trabaja con los animales, basada en la empatía, la responsabilidad y la profesionalidad.

Póster presentado en el XVI Congreso de la Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio SECAL/Noviembre 2021/Leida



The International Culture of Care Network



En nuestro animalario,  
**primero**  
el bienestar  
**animal**

**Bie  
nes  
tar**



 sociedad española  
para las ciencias  
del animal de laboratorio

[www.secal.es](http://www.secal.es)

## Criopreservación en pez cebra

**Juan Ramos Blasco**

*Departamento Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universitat Autònoma de Barcelona*

**Palabras clave:** *Danio rerio*, protocolo ZIRC, criopreservación.

### INTRODUCCIÓN

El uso de *Danio rerio* (pez cebra) como modelo animal de investigación ha tenido un crecimiento exponencial en los últimos años. Esto se ha debido a que el pez cebra tiene una serie de características biológicas como su fecundación y desarrollo externo que, unido a su traslucidez y relativo gran tamaño de los huevos y embriones, facilitan su manipulación y la generación de peces transgénicos. La gran homología genética con el ser humano (más del 70%) permite la traslación de las experiencias a otros vertebrados, incluido el ser humano, siendo un modelo ideal para la biología del desarrollo, toxicología o estudios de regeneración entre otros campos. Esto ha permitido que en relativamente poco tiempo se hayan creado más de 20.000 líneas de pez cebra entre mutantes, transgénicas y silvestres, y se siguen generando multitud de ellas cada año.

La gran cantidad de líneas generadas representa un gran desafío técnico, logístico, y ético en la comunidad del pez cebra. El mantenimiento de una línea implica el uso de instalaciones, espacio, personal y animales a tal fin. Así mismo, el mantenimiento de las líneas *in vivo* implica la asunción de ciertos riesgos como pueden ser perder las líneas (por accidentes o problemas biológicos) o que se produzcan procesos endogámicos o de deriva genética, alterando la línea a mantener. Esta gran cantidad de recursos necesarios movilizados, sin una finalidad directa, además de suponer un elevado gasto, también entra en confrontación directa con los principios básicos de la ética en la experimentación animal, conocidos como las 3Rs (Reducción, Reemplazamiento y Refinamiento). Por ello, el desarrollo de técnicas de criopreservación que permitan mantener estas líneas congeladas de una manera eficaz y sin riesgo es una necesidad.

### CRIOPRESERVACIÓN EN PECES

La criopreservación de peces ha tenido una limitación desde el principio, ya que sólo se han podido congelar gametos masculinos. Respecto a los gametos femeninos y los embriones,

que en otras especies sí se congelan, en peces aún se están poniendo a punto los protocolos experimentales que permitan hacerlo, y hoy en día sigue siendo un proceso muy poco viable. Por ello, actualmente, sólo se puede criopreservar la mitad de la información genética de estas líneas, lo que representa una limitación a la hora de recuperar las mismas. Esto se debe a que los embriones de peces son mucho más grandes que los de mamíferos (en *Danio rerio* son 1000 veces más grandes), lo que implica una baja relación entre la superficie y el volumen, siendo mucho más difícil la entrada o salida del agua y del agente crioprotector. El embrión también presenta distintos compartimentos, con permeabilidades relativas distintas, especialmente la membrana sincital, lo que también dificulta la introducción de los agentes crioprotectores. Por si esto fuese poco, la yema, que es de gran tamaño, presenta una membrana muy susceptible de ser dañada durante el proceso de criopreservación. Por ello, gran cantidad de estudios se han centrado en mejorar la penetración del crioprotector dentro del embrión mediante decoronación, en la extracción parcial de la yema, o en la expresión artificial de acuaporinas<sup>1</sup>, lo que ha permitido pequeños avances al respecto.

La criopreservación es un proceso por el cual las células o tejidos completos se conservan, enfriándolos a bajas temperaturas, por lo general a -196°C (el punto de ebullición del nitrógeno líquido). A estas temperaturas, cualquier actividad biológica, incluidas las reacciones bioquímicas, se detienen. Durante este proceso, las células pueden ser dañadas por la congelación y la formación de cristales de hielo extracelulares o intracelulares. El proceso de la criopreservación tiene dos procesos claves, el reemplazamiento del agua intracelular por el crioprotector, y la posterior congelación o descongelación de la célula. El reemplazamiento del agua por un crioprotector evita la formación de cristales en la congelación y los consiguientes daños celulares. En segundo lugar, el enfriamiento y recalentamiento de las muestras hacia y desde temperaturas criogénicas debe ser más rápida que la formación del hielo. Estas tasas de "enfriamiento crítico" y "calentamiento crítico" y el tipo de

# REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA

agente crioprotector y la concentración para la criopreservación están inversamente relacionados, es decir, cuanto mayor sea la concentración del crioprotector menor será la velocidad de enfriamiento o calentamiento.

El uso de agentes crioprotectores es un aspecto crucial en todos los protocolos, desde la congelación lenta hasta la vitrificación. Los crioprotectores se pueden clasificar en no permeables (o externos) y permeables (internos), dependiendo de su capacidad para penetrar las membranas biológicas. Algunos ejemplos de crioprotectores no permeables son la glucosa, la sacarosa o la polivinilpirrolidona (PVP). Por otro lado, algunos crioprotectores permeables son el dimetilsulfóxido (DMSO), el 1,2-propanodiol, el glicerol, el etilenglicol, y el metanol, entre otros.

La velocidad óptima de enfriamiento depende de muchos factores, incluido el tipo de célula, los agentes crioprotectores, y otros componentes de la solución. A velocidades de enfriamiento normales la cristalización comienza en el compartimento extracelular. A medida que se forma el hielo, la concentración de electrolitos extracelulares aumenta y da como resultado una deshidratación osmótica de las células. En el proceso de congelación, si las velocidades de enfriamiento son demasiado lentas, el aumento de la concentración de electrolitos resultante puede provocar daños irreversibles en las células, mientras que, si las velocidades de enfriamiento son demasiado rápidas, se pueden formar cristales de hielo intracelulares y provocar un daño celular. Por lo tanto, para obtener la máxima viabilidad hay que evaluar las concentraciones de crioprotectores y la velocidad de congelación.

## CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMA EN *Danio rerio*

Aunque, desde los años 80 Harvey desarrolló un protocolo de congelación de esperma basado en el uso de metanol y leche en polvo, no es hasta el año 2000, cuando el uso de las técnicas de criopreservación se empieza a generalizar, que se comienzan a generar gran cantidad de líneas. Además, la adopción por muchos laboratorios del pez cebra como modelo de investigación hizo que se extendiese el uso de la criopreservación en el *Danio rerio*. Ya Harvey en su publicación apreció gran variabilidad en los resultados de su protocolo. Esta baja reproducibilidad ha dificultado la adopción del protocolo por otras instalaciones y ha favorecido el desarrollo de gran cantidad de protocolos, adaptados a cada instalación<sup>2</sup> (ver Figura 1).

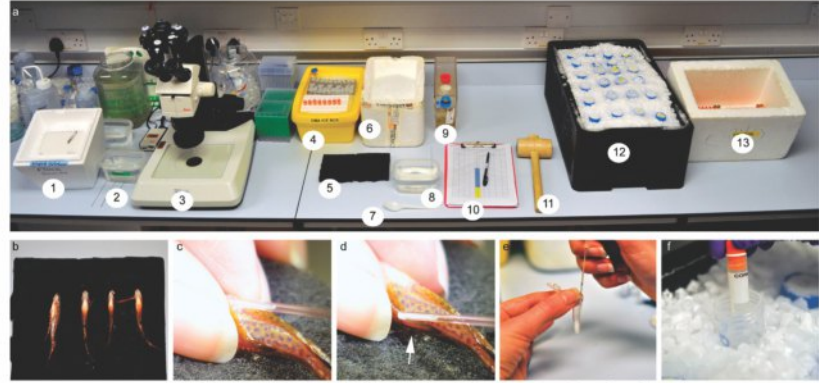


Imagen suministrada por la autora

**Figura 1.-** A. Elementos necesarios para la criopreservación. De izquierda a derecha (1) bloque de hielo seco, (2) triclaína, (3) lupa estereoscópica, pipetas de 1000 y 200  $\mu$ l, recipiente, (4) caja de hielo para tubos de las alícuotas crioprotectoras y crioviales, (5) esponja con hendiduras para manipular peces anestesiados, (6) caja de hielo para crioviales, (7) cuchara de plástico (8) triclaína para anestesia, (9) tanque de peces con machos, (10) hoja de registro, (11) mazo para introducir los tubos Falcon en hielo seco, (12) caja de hielo seco y (13) caja con nitrógeno líquido. B. Machos inmovilizados. C. Extracción de esperma. D. Esperma de buena calidad. E. Introducción del esperma en el crioprotector. F. Introducción de crioviales en hielo seco (dentro de un Falcon). Fuente: Multi-allelic Phenotyping - A systematic approach for the simultaneous analysis of multiple induced mutations. *Methods*. 2013;15;62(3):197-206.

Uno de los factores que más influye en los resultados obtenidos en la congelación de esperma es la calidad del esperma del macho. Clásicamente, el esperma se evaluaba mediante el empleo del "ojímetro", que era capaz de evaluar la concentración espermática por el color que presentaba y la motilidad del esperma gracias al uso de un microscopio. A fin de poder estandarizar los protocolos de criopreservación, diversos estudios a tal efecto se han realizado intentando establecer criterios extrapolables y objetivos<sup>3</sup>. La motilidad del esperma parece ser el factor que más influye en la calidad y fertilidad del mismo, y, actualmente, puede ser evaluada mediante programas informáticos (CASA). Estos programas ya son capaces de cuantificar y discernir entre la velocidad curvilínea (VCL), la velocidad lineal (VSL), y la velocidad media (VAP), clasificándolos de una manera objetiva en: rápidos, medios y lentos. La concentración espermática ha pasado de evaluarse por el color a hacerse mediante el uso del nanodrop, objetivando los resultados obtenidos (<https://zebrafish.org/wiki/protocols/cryo>).

El esperma parece estar influenciado por la propia línea genética tanto en el volumen y concentración del esperma producido,

# REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA

ANIMALES DE LABORATORIO

PRIMAVERA 2022 / NÚMERO 93

como en la calidad del mismo. Por ello, se deberían en primer lugar caracterizar las propias líneas genéticas en cuanto a su producción espermática a fin de poder estandarizar los protocolos. Así mismo, parece que la edad de los peces y el tiempo de reposo entre extracciones espermáticas también influyen en la calidad y cantidad de espermia obtenido: si aumentamos el intervalo entre extracciones, el volumen aumenta, mientras que la integridad o calidad del espermia disminuye. También se puede mejorar la calidad espermática mediante la implantación del uso de la artemia en la dieta de los reproductores, así como aislando a los machos de sus congéneres, ya que, al igual que en los mamíferos, aumenta el volumen del eyaculado.

La extracción del semen puede resultar otro punto crítico en la congelación del mismo. Para ello lo primero de todo será anestesiarse al macho a fin de poder manipularlo correctamente. Mediante un masaje cráneo caudal de la cavidad celómica, el semen saldrá de la cloaca donde podrá ser recolectado mediante un pipeteado (ver Figura 2). Justo en este momento existe el riesgo de que el espermia se active, ya que este proceso se realiza al entrar en contacto con un medio hiposmótico. Así pues, la existencia de agua (si no se ha secado bien la zona) o de orina pueden activar el espermia y disminuir su viabilidad y fertilidad. El espermia de pez cebra es inmóvil en los testículos y, para la inhibición completa de la motilidad espermática, se requiere de una osmolaridad de  $\geq 300$  mmol/kg. Esto se corresponde con la osmolaridad media del plasma sanguíneo del pez cebra. La velocidad y la duración de la natación de los espermatozoides dependen de la osmolaridad. A una osmolaridad baja, los espermatozoides activados nadan más rápido y durante menos tiempo, mientras que a mayor osmolaridad los espermatozoides activados nadan más despacio, pero durante más tiempo. La activación de la motilidad en el espermia de pez cebra es reversible y esta se puede detener elevando la osmolaridad de nuevo a  $>300$  mmol/kg. Por ello durante los procesos de criopreservación de *Danio rerio*, se emplea una solución para su dilución de una osmolaridad alta (E400) que inhibe la movilidad del espermia durante su extracción alargando su vida útil<sup>4</sup>. Este medio puede tener distinta composición, ya que se emplean diversos *buffers* para taponarlo como pueden ser el HEPES, TRIS, tircina, o bífina; que presentan distintas toxicidades celulares.

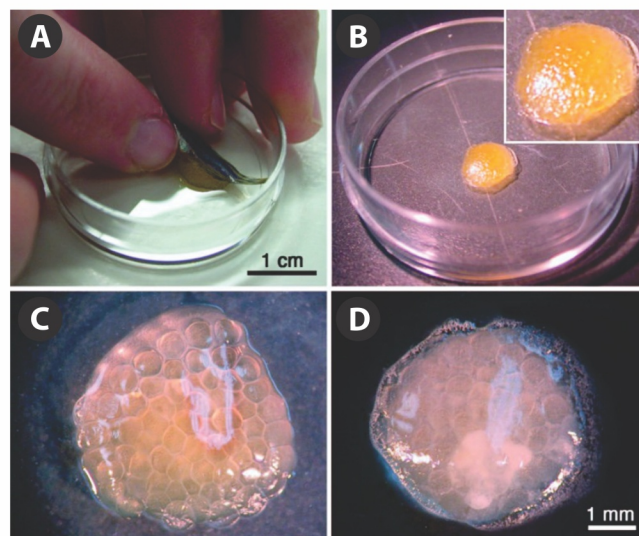


Imagen suministrada por la autora

**Figura 2.-** Evaluación visual de la calidad de los oocitos. **A.** Masaje celómico a la hembra. **B-C.** Oocitos de “buena” calidad. Los huevos son amarillentos y translúcidos a la luz transmitida. **D.** Lote de huevos de “mala” calidad. Fuente: *Cryopreservation and In Vitro Fertilization at the Zebrafish International Resource Center. Methods Mol Biol.* 2009;546:45-65.

El uso de distintos agentes crioprotectores<sup>5-7</sup>, también tiene una clara influencia en los índices de fertilidad, daño espermático, y las malformaciones de los embriones. Existen distintos protocolos que exploran el uso de diferentes crioprotectores como pueden ser la leche en polvo, metanol, N-N dimetilformamida, etelinglicol, propelinglicol, DMSO, o glicerol. Como anteriormente hemos mencionado el uso de uno u otro, así como la concentración del crioprotector, tendrán implicaciones directas sobre la velocidad de congelación. Por ello se está intentando dilucidar la influencia del uso de estos agentes sobre los daños que se generan en el espermia y las alteraciones que se producen en la progenie, tanto por la asimilación de agente crioprotector, como por el propio proceso de congelación o descongelación<sup>8</sup>.

La evaluación de los daños en el espermia se está empezando a caracterizar evaluando diversos parámetros, a fin de intentar estandarizar y extrapolar los resultados de una manera más fiable. Durante todo el proceso de criopreservación, el espermia es sometido a un estrés oxidativo, que se traduce en una pérdida de

# REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA

la integridad de la membrana, así como del ADN, evaluándose estos daños con el Halomax y comet assay<sup>19</sup>. Estos daños se pueden observar también en la morfología de los espermatozoides. Así, se ha visto que los cambios morfológicos más frecuentes producidos por la criopreservación son la macrocefalia, la presencia de la cabeza suelta, una cabeza degenerada, o alteraciones en la cola del espermatozoide ya sea rizándose o acortándose. Si estos daños son compatibles con el desarrollo del embrión, podremos observar cómo se mantienen durante el desarrollo, produciéndose alteraciones en los arcos branquiales, fusiones vertebrales, y otras alteraciones esqueléticas graves. La minimización de estos daños evita que las posibles alteraciones, que la criopreservación produce, modifiquen significativamente la línea que se está guardando. Para ello el ajuste del crioprotector, su concentración, así como la velocidad de congelación y descongelación resultan vitales. Actualmente, también se están explorando vías alternativas que minimicen este impacto sobre el ADN disminuyendo el estrés oxidativo. Así, el uso de catalasa<sup>10</sup>, la melatonina en los embriones<sup>11</sup>, o el uso de ciertos crioprotectores<sup>12</sup> han demostrado ser efectivos a la hora de disminuir esta metilación en el material genético.

## NUEVAS TÉCNICAS DE CRIOPRESERVACION

En la actualidad, se han desarrollado nuevos protocolos que permiten la criopreservación de los testículos enteros, ya sea por congelación o por vitrificación. Para ello se deben extraer los testículos, por ejemplo, mediante el uso de agujas de acupuntura para, tras la exposición de los agentes crioprotectores, proceder a su criopreservación. Esta técnica cuenta con la ventaja de que son las espermatogonias las que se congelan, lo que permite la generación directa de un reproductor de la línea deseada. Mediante un proceso de digestión, se eliminan los espermatozoides, lo que facilitará las manipulaciones posteriores y el trasplante de las espermatogonias en la larva receptora. Además, mediante esta técnica, se reduce el uso de agentes crioprotectores, disminuyendo el daño celular y del ADN, lo que mejora los índices de éxito y reproducibilidad de la técnica. Las espermatogonias tras su descongelación son trasplantadas en embriones de 7 días de *Danio rerio*. Las espermatogonias trasplantadas ya sean congeladas o vitrificadas conservan su capacidad migratoria, incorporándose a las gónadas receptoras, además de conservar su actividad mitótica, por lo que son capaces de proliferar en las gónadas receptoras. Pero hay que tener presente que sólo se desarrollarán machos, ya que las espermatogonias al colonizar las gónadas desarrollarán testículos. Por lo tanto, el desarrollo de esta técnica facilita la

recuperación de las líneas, asegurando unas buenas tasas de proliferación de las espermatogonias y generando un progenitor quimérico de la línea a recuperar, lo que es especialmente útil en dobles mutantes<sup>13</sup>.

La congelación de las células germinales primordiales representa una opción aún más prometedora, ya que estas células pueden dar lugar fácilmente a espermatozoides y ovocitos funcionales a través del quimerismo de la línea germinal. Estas células se deben obtener de embriones de no más de 24 horas de desarrollo<sup>14</sup>. La principal desventaja de estas técnicas es que requieren mucha experiencia para el trasplante de células y, por lo tanto, se usan principalmente de forma experimental. Alternativamente, la criopreservación de espermatozoides de pez cebra es más fácil y, por ello se sigue usando mucho más.

La criopreservación de embriones de pez cebra se ha estado intentando desarrollar desde hace tiempo<sup>15,17</sup>, mediante la microinyección de crioprotectores en el vitelo. De esta manera se salvaba así la barrera sincital, que era uno de los principales problemas. Pero aun así seguía fallando, debido a que las tasas de descongelación por convección eran demasiado lentas y eso conllevaba a la formación de cristales. El uso del láser ha permitido alcanzar velocidades de descongelación de 10 millones de °C/min, alcanzándose así la tasa de descongelación necesaria. El procedimiento consiste en la microinyección de los crioprotectores en el vitelo para, posteriormente y gracias a un baño, deshidratar el espacio perivitelino, lo que facilitará su congelación (ver Figura 3). La inclusión de unas nanovarillas de oro cubiertas de glicol en el crioprotector evita la formación de gradientes de temperatura en los diversos compartimientos del embrión durante la descongelación, ya que el calor procedente del láser se puede difundir de manera homogénea gracias a la misma. Mediante esta técnica se han conseguido criopreservar embriones y que estos fueran capaces de sobrevivir hasta alcanzar los 5 días, aunque todavía con tasas de éxito muy bajas<sup>17</sup>.

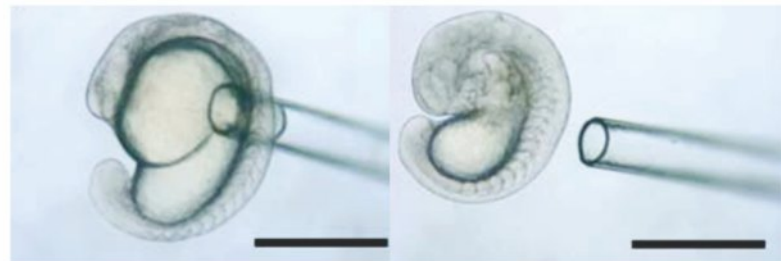


Imagen suministrada por la autoría

**Figura 3.-**Extracción del vitelo previa a la congelación de embriones. Fuente: Higaki S, Eto Y, Kawakami Y, et al. *Production of fertile zebrafish (*Danio rerio*) possessing germ cells (gametes) originated from primordial germ cells recovered from vitrified embryos*. Reproduction. 2010;139(4):733-740.

Las técnicas de criopreservación son una herramienta necesaria para poder gestionar las líneas, ya sea en los laboratorios o en los centros repositivos. Además, se creía que también podía ser una herramienta muy útil a la hora de poder controlar a ciertos patógenos, al no ser capaces de resistir la criopreservación. Lamentablemente, se ha visto que *Mycobacterium chelonae* y *Mycobacterium marinum* no disminuyen significativamente su concentración tras el proceso de congelación, por lo tanto, no parece ser una barrera eficaz frente a la ubicuidad de estos patógenos. *Edwardsiella ictaluri* y *Pseudoloma neurophila*, sí que mostraron ser mucho más sensibles a estos procesos, bajando su concentración de una manera significativa, pero aun así son capaces de sobrevivir al proceso de criopreservación. Por lo tanto, la criopreservación no puede ser utilizada para la creación de colonias libres de patógenos, excepto para *Pseudocapillaria tomentosa*, los cuales suelen presentar una elevada prevalencia en las colonias de *Danio rerio*. Así pues, cuando se requiera de la congelación de una línea, el donante de semen, al igual de que la hembra donante de oocitos, deberán ser testeados, para así evitar que este proceso vehicule la transmisión de los patógenos.

## CONCLUSION

Las técnicas de criopreservación son necesarias para poder gestionar la gran cantidad de líneas generadas y facilitar el intercambio entre los laboratorios. En pez cebra, estas técnicas presentan unos problemas técnicos que no han permitido hasta ahora la congelación práctica de embriones, siendo la congelación de esperma la técnica más utilizada. A pesar que la congelación del esperma presenta una serie de limitaciones y que los procesos de criopreservación pueden alterar la información genética almacenada, cada vez más laboratorios la están aplicando. El desarrollo del último protocolo del ZIRC parece ser el más extendido entre los distintos laboratorios ([https://zebrafish.org/wiki/\\_media/protocols/cryo/zirc\\_rmmb\\_freezing\\_protocol.pdf](https://zebrafish.org/wiki/_media/protocols/cryo/zirc_rmmb_freezing_protocol.pdf)).

## BIBLIOGRAFÍA

- Cattelan S and Gasparini C. *Male sperm storage impairs sperm quality in the zebrafish*. Sci Rep. 2021;11(1):16689.
- Brian Harvey R, Norman Kelley M, and Ashwood-Smith J. *Cryopreservation of zebra fish spermatozoa using methanol*. Canadian Journal of Zoology. 1982;60(8):1867-1870.
- Diogo P, Martins G, Eufrásio A, et al. *Selection Criteria of Zebrafish Male Donors for Sperm Cryopreservation*. Zebrafish. 2019;16(2):189-196.
- Matthews JL, Murphy JM, Carmichael C, et al. *Changes to Extender, Cryoprotective Medium, and In Vitro Fertilization Improve Zebrafish Sperm Cryopreservation*. Zebrafish. 2018;15(3):279-290.
- Rodrigues RB, Uczay M, Brito VB, et al. *Skim milk powder used as a non-permeable cryoprotectant reduces oxidative and DNA damage in cryopreserved zebrafish sperm*. Cryobiology. 2020;97:76-84.
- Best BP. *Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions*. Rejuvenation Res. 2015;18(5):422-436.
- Cheng Y, Franěk R, Rodina M, et al. *Optimization of Sperm Management and Fertilization in Zebrafish (Daniorerio (Hamilton))*. Animals (Basel). 2021;11(6):1558.
- Rodrigues RB, Uczay M, Brito VB, et al. *Skim milk powder used as a non-permeable cryoprotectant reduces oxidative and DNA damage in cryopreserved zebrafish sperm*. Cryobiology. 2020;97:76-84.
- Reinardy H, Skippins E, Henry T, et al. *Assessment of DNA damage in sperm after repeated non-invasive sampling in zebrafish Danio rerio*. Journal of fish biology. 2013;82:1074-1081.
- Hagedorn M, McCarthy M, Carter VL, et al. *Oxidative stress in zebrafish (Daniorerio) sperm*. PLoSOne. 2012;7(6).
- Castro PL, Ferraz ALJ, Patil JG, et al. *Use of melatonin as an inhibitor of apoptotic process for cryopreservation of zebrafish (Danio rerio) embryos*. Braz J Biol. 2021;82.
- Bono-Mestre C, Cardona-Costa J, and García-Ximénez F. *Effects on cell viability of three zebrafish testicular cell or tissue cryopreservation methods*. Cryo Letters. 2009;30(2):148-152.
- Marinović Z, Li Q, Lujčić J, et al. *Preservation of zebrafish genetic resources through testis cryopreservation and spermatogonia transplantation*. Sci Rep 2019;9, 13861.
- Riesco MF, Martínez-Pastor F, Chereguini O, et al. *Evaluation of zebrafish (Danio rerio) PGCs viability and DNA damage using different cryopreservation protocols*. Theriogenology. 2012;77(1):122-130.
- Janik M, Kleinhans FW, and Hagedorn M. *Overcoming a permeability barrier by microinjecting cryoprotectants into zebrafish embryos (Brachydanio rerio)*. Cryobiology. 2000;41(1):25-34.
- Zhang T, Rawson D, and John Morris G. *Cryopreservation of pre-hatch embryos of zebrafish (Brachydanio rerio)*. Aquatic Living Resources, 1993;6(2),145-153.
- Khosla K, Kangas J, Liu Y, et al. *Cryopreservation and Laser Nanowarming of Zebrafish Embryos Followed by Hatching and Spawning*. Adv. Biosys. 2020;4.



# SolutionsProvider

Over the past 50 years our goal has been to serve science with integrity and care. With the expansion of our solutions for the laboratory animal science community we can offer more support, and more choices, to help you in your quest to improve lives around the world through scientific discovery.



DISTRIBUIDOR EN ESPAÑA

[WWW.SODISPAN.COM](http://WWW.SODISPAN.COM)

## Métodos computacionales de vanguardia para predecir la toxicidad acuática de productos biocidas, medicamentos y cosméticos

**Rafael Gozalbes**

ProtoQSAR SL, Centro Europeo de Empresas Innovadoras, Parque Tecnológico de Valencia

**Palabras clave:** *in silico*, predicción, toxicidad.

### INTRODUCCIÓN

La evaluación temprana del perfil ecotoxicológico de los productos químicos es de gran relevancia para limitar un potencial impacto negativo en el medio ambiente. En lo que refiere al medio acuático (océanos, ríos, lagos, embalses, etc.), destacan contaminantes como bacterias, virus, parásitos, fertilizantes, fármacos o plásticos, y aunque existen diversos factores naturales, por desgracia lo más habitual es que el deterioro del agua proceda de las actividades humanas. Los vertidos de productos químicos procedentes de diversos sectores industriales están entre las causas principales de la eutrofización del agua<sup>1</sup>.

El potencial tóxico de un gran número de sustancias químicas industriales –productos farmacéuticos, cosméticos, pesticidas, etc.– se suele evaluar mediante el uso de modelos animales estándar. Este tipo de estudios son necesarios para el cumplimiento de diferentes normativas europeas, entre las que destaca REACH<sup>2</sup> (del inglés *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*), que obliga a fabricantes e importadores de sustancias químicas de la Unión Europea a remitir un expediente de registro a la Agencia Europea de Productos Químicos (*European Chemicals Agency, ECHA*, [www.echa.europa.eu/](http://www.echa.europa.eu/)) y comunicar la información necesaria para garantizar su uso seguro. Debido a la gran cantidad de pruebas con animales que se realizan cada año<sup>3</sup>, las agencias reguladoras y las empresas están cada día más interesadas en métodos alternativos que puedan utilizar complementariamente a los ensayos de laboratorio tradicionales, y permitan minimizar el tiempo, los costes y los recursos necesarios.

Existen diversos métodos alternativos como el uso de organismos inferiores (p. ej. bacterias, o algas), las técnicas *in vitro* (fundamentalmente cultivos celulares u órganos perfundidos), o

los métodos computacionales (también denominados *in silico*), que permiten hacer una estimación de valores de toxicidad medioambiental mediante el uso de técnicas estadísticas avanzadas y de aprendizaje automatizado (*machine learning*). Estos modelos generados por ordenador –sin necesidad de ejecutar ningún tipo de ensayo de laboratorio– se caracterizan por su facilidad de uso, y son aplicables de forma sencilla e inmediata a sustancias de las que se conoce su estructura química; pudiendo realizar predicciones de parámetros de interés sobre compuestos “virtuales” que ni tan siquiera se hayan sintetizado todavía en la realidad<sup>4,5</sup>.

El panel de métodos computacionales que pueden utilizarse es amplio, e incluye la determinación de toxicóforos (subgrupos químicos responsables de efectos toxicológicos) que permitan desarrollar sistemas de alertas para la detección temprana, estudios de interacción molecular entre receptores biológicos y sus potenciales moduladores (lo que se conoce como acoplamiento molecular o *docking*), o simulaciones por dinámica molecular de sistemas biológicos complejos (ver Figura 1).



Imagen suministrada por la autoría

**Figura 1.-** El uso de técnicas computacionales forma parte de la estrategia habitual de la evaluación toxicológica y el desarrollo de nuevos compuestos optimizados.

# MÉTODOS ALTERNATIVOS

Entre todas las herramientas posibles, ocupa un lugar destacado el desarrollo de modelos de relación cuantitativa estructura-actividad (los QSARs, del inglés *Quantitative Structure-Activity Relationships*) generados a partir de bases de datos con información toxicológica de compuestos. La estructura química de estos compuestos se caracteriza numéricamente por descriptores moleculares, y éstos se relacionan matemáticamente con el parámetro toxicológico objeto de estudio por medio de herramientas estadísticas, algoritmos específicos de aprendizaje automático o redes neuronales. Los QSARs son modelos relativamente sencillos que pueden automatizarse e implementarse en plataformas de predicción, en las que el usuario únicamente ha de introducir o dibujar una estructura o una librería de estructuras químicas, y obtener de forma rápida la predicción del parámetro estudiado para su(s) molécula(s) de interés<sup>6</sup>.

El uso de los QSARs no se ciñe a un ámbito determinado, sino que pueden aplicarse en todos aquellos campos en los cuales se dispone de bases de datos aptas para la generación de los modelos. Una de las áreas en las que más se ha trabajado es en el desarrollo de nuevos fármacos<sup>7</sup>, tanto a nivel de la predicción de actividades terapéuticas, como también de parámetros farmacocinéticos (ADME)<sup>8</sup> o efectos indeseados<sup>9</sup>. También se han desarrollado modelos adaptados a cosmética, agroquímica, o más recientemente, en nuevos campos como la optimización de péptidos terapéuticos<sup>10</sup> y la predicción de efectos toxicológicos de nuevos nanomateriales<sup>11</sup>.

Un campo en el que los QSARs están teniendo una gran relevancia es en la predicción de la ecotoxicidad, ya que se pueden aplicar a las evaluaciones de riesgo ambiental para los contaminantes comunes, y de hecho estos modelos están siendo ampliamente promocionados y reconocidos a nivel regulatorio por las instancias internacionales correspondientes como la ECHA<sup>12</sup>. Existe pues una necesidad de ampliar el conocimiento en los métodos *in silico* en general y en los QSARs en particular, y al mismo tiempo, en facilitar y extender el uso de las herramientas computacionales por parte de quienes pueden ser sus más directos beneficiarios. Diferentes programas informáticos están disponibles en la actualidad para la evaluación de riesgos<sup>12</sup>, aunque no siempre son fáciles de usar por parte de personal no especializado en estas metodologías.

En ProtoQSAR hemos participado recientemente en dos proyectos europeos para la evaluación de toxicidad acuática: COMBASE (<https://www.life-combase.com/>) y *EcoCosmePharm*

(<https://cordis.europa.eu/project/id/845373> y <https://protoqsar.com/proyecto-eco-cosmepharm/>); enfocados respectivamente a la evaluación de biocidas y productos residuales provenientes de las industrias farmacéutica y cosmética. En las siguientes secciones vamos a describirlos brevemente, así como sus principales resultados y aplicaciones prácticas.

## COMBASE

Los biocidas son sustancias empleadas para prevenir o atenuar la acción de organismos nocivos, o incluso destruirlos. Sin embargo, sus efectos pueden no limitarse a los patógenos a los que están destinados, sino que pueden afectar a la salud humana y al medio ambiente. Para favorecer el uso sostenible de los biocidas, su comercialización y uso a nivel europeo, deben seguir estrictamente el Reglamento de la UE nº 528/2012 (*Biocidal Products Regulation, BPR*)<sup>13</sup>, garantizando así la protección de las personas y el entorno natural. Esta normativa presenta el inconveniente del gran número de ensayos con animales requeridos para cumplir con los requisitos de información; por lo que la propia BPR promueve el uso de métodos alternativos, como el desarrollo y aplicación de algoritmos y modelos que permitan predecir diversos parámetros biológicos y ambientales a partir de la estructura química de las sustancias.

El objetivo del proyecto europeo COMBASE (*Computational tool for the assessment and substitution of biocidal active substances of ecotoxicological concern*, [www.life-combase.com](http://www.life-combase.com)) fue desarrollar una herramienta computacional que integre modelos predictivos de toxicidad acuática para sustancias biocidas en cuatro niveles tróficos: bacterias, algas, crustáceos y peces. Gracias a este proyecto y por primera vez en Europa, se ha integrado una base de datos con información ecotoxicológica específica en biocidas, junto con un conjunto de modelos computacionales validados experimentalmente para confirmar su eficacia y con validez regulatoria; todo ello, implementado en una plataforma de acceso libre. Esta plataforma permite predecir los metabolitos y productos de degradación generados a partir de las sustancias biocidas, al igual que los efectos ecotóxicos tanto de los biocidas durante su vida útil como los de los metabolitos mencionados.

Al inicio del proyecto se compiló toda la información disponible de sustancias activas biocidas y sus metabolitos, incluyendo las estructuras químicas y sus efectos ecotoxicológicos. En esta lista se incluyeron todos los biocidas conocidos o en revisión, incluyendo los cuatro grupos principales (desinfectantes, conservantes, plaguicidas y biocidas especiales), y los 22 tipos de

# MÉTODOS ALTERNATIVOS

ANIMALES DE LABORATORIO  
PRIMAVERA 2022 / NÚMERO 93

biocidas según la clasificación BPR13. En total se completó una colección de 405 compuestos (202 sustancias biocidas activas y 203 metabolitos).

A partir de la base de datos construida, se desarrolló un conjunto de modelos para cuatro niveles tróficos (microorganismos, algas, dafnias y peces). Para proceder a la construcción de los modelos QSAR, el enfoque seguido fue similar en todos los casos: (i) caracterización de las estructuras químicas de los biocidas por un conjunto de descriptores numéricos (se utilizaron descriptores topológicos teniendo en cuenta su sencillez, rapidez en el cálculo, y su reconocida capacidad para describir la naturaleza química); (ii) división aleatoria de los conjuntos de datos de compuestos en conjuntos de entrenamiento y validación; (iii) desarrollo de los algoritmos matemáticos y validación de los mismos por sus parámetros de predicción estándar estadísticos, que permitan corroborar estadísticamente su robustez y poder predictivo; y (iv) validación final de los modelos por su aplicación a los conjuntos de compuestos de validación elegidos al azar previamente. Los modelos se desarrollaron de acuerdo con las directrices de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE, <https://www.oecd.org/>)<sup>12,14</sup>, con el fin de garantizar su uso desde una perspectiva regulatoria.

De gran relevancia para COMBASE fue la validación experimental de los modelos desarrollados, con el fin de garantizar su robustez y capacidad predictiva. Se realizaron ensayos sobre una docena de compuestos *in vitro* e *in vivo* en los cuatro niveles tróficos, según los ensayos estándar regulados por las guías de la OCDE.

Estas pruebas experimentales corroboraron las predicciones hechas por los modelos para los cuatro niveles tróficos, representando un buen ejemplo de complementariedad entre ensayos tradicionales y métodos alternativos.

Los requisitos y especificaciones de la plataforma de software COMBASE, se recopilaron de las partes interesadas e involucradas en la cadena de valor completa de los productos biocidas, incluidos los reguladores, los productores y formuladores de biocidas y las asociaciones de consumidores. Para identificar y analizar las necesidades de las partes interesadas, se llevaron a cabo encuestas y entrevistas telefónicas y personales.

El resultado final del proyecto fue la herramienta web COMBASE, de libre acceso mediante un simple registro en <http://webtool.life-combase.com> (ver Figura 2). La herramienta incluye:

- Una base de datos experimentales de sustancias activas biocidas y sus correspondientes metabolitos, y una propuesta de categorización de sustancias de acuerdo con el Reglamento de la UE (CE) nº 1272/2008 sobre clasificación, etiquetado y envasado (CLP, de *Clasificación, Labelling and Packaging*).
- Una herramienta predictiva para la identificación de metabolitos generados dentro del ciclo de vida de sustancias centrándose en las reacciones que tienen lugar en el compartimento de agua dulce.



Imagen suministrada por la autoría

Figura 2.- Ejemplo de información predictiva de ecotoxicidad acuática para cuatro niveles tróficos obtenida con la plataforma COMBASE.

# MÉTODOS ALTERNATIVOS

- Identificación rápida del potencial efecto biocida de sustancias de interés basada en la determinación del espacio químico global definido por los biocidas conocidos.
- Un conjunto de modelos QSAR que predicen los efectos agudos de sustancias químicas para peces, dafnias, algas y microorganismos y categorizan dichos valores siguiendo el mismo enfoque utilizado para los datos experimentales.
- Un módulo adicional para la evaluación de sustancias químicas alternativas con potencial efecto biocida, pero con un menor impacto ambiental. Para ello, en combinación con el módulo anterior (QSARs), el usuario puede no sólo conocer la toxicidad potencial de biocidas, sino buscar opciones menos tóxicas, pero igualmente eficaces.

Además, COMBASE también se presenta como una aplicación móvil (APP) dirigida principalmente a usuarios profesionales de biocidas y consumidores, proporcionando instrucciones para su uso sostenible.

Estas herramientas han sido validadas por entidades de carácter académico, industrial y regulatorio ajeno al proyecto. Los comentarios recibidos durante el proceso de validación externa se consideraron cuidadosamente y se implementaron optimizaciones tanto en la herramienta web COMBASE como en la aplicación móvil, hasta llegar a su formato definitivo actual.

## ECOCOSMEPHARM

Las industrias farmacéutica y cosmética se encuentran entre las industrias del sector químico que producen más residuos. Por otra parte, después de su administración al ser humano, los ingredientes farmacéuticos activos (APIs) y sus metabolitos se excretan del cuerpo por la orina y las heces, llegando a las aguas residuales. Todos estos productos residuales son muy capaces de mostrar efectos adversos imprevistos en especies ecológicas cuando se liberan en el medio ambiente, y otra preocupación importante es que estos productos químicos liberados involuntariamente al agua –aunque en bajas concentraciones– pueden representar un alto riesgo para la salud humana después de la ingestión durante un período prolongado de agua potable contaminada, e incluso existe un riesgo notable de contaminación a través de la cadena alimentaria. Aunque por supuesto existen plantas de tratamiento de aguas residuales, la mayoría de ellas no están diseñadas para eliminar estos productos

químicos y, por lo tanto, los productos finales farmacéuticos y cosméticos se liberan fácilmente al medio ambiente acuático.

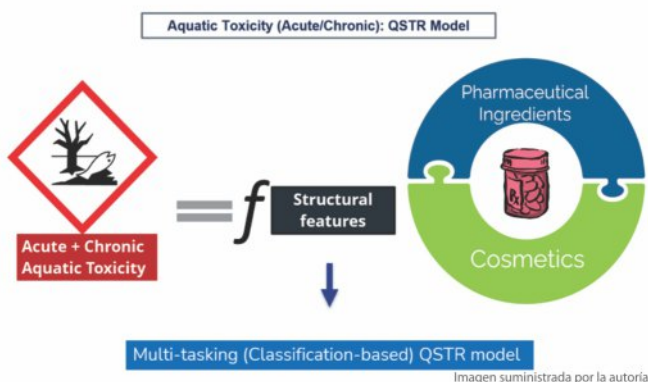
Aunque hay una gran variedad de productos químicos utilizados o producidos en los sectores mencionados, los que tienen un mayor impacto en el medio ambiente son fundamentalmente los solventes y los productos finales (es decir los ingredientes activos farmacéuticos y cosméticos)<sup>15</sup>. Por desgracia, estos productos químicos pueden desembocar fácilmente en diferentes compartimentos ambientales durante su fabricación, uso y/o eliminación. Algunos se adsorben y se depositan en los suelos, pero la mayoría son solubles en agua y tienen baja volatilidad, con lo que pueden transportarse muy fácilmente a los compartimentos acuáticos del medio ambiente. Un estudio reciente publicado en PNAS ha investigado la contaminación por medicamentos en ríos de todo el mundo, dentro de un Proyecto de Vigilancia Mundial de Productos Farmacéuticos. Según este estudio, una cuarta parte de los ríos analizados (258 ríos de 104 países diferentes) tienen niveles tóxicos de este tipo de sustancias<sup>16</sup>.

El objetivo principal del proyecto EcoCosmePharm fue el desarrollo de modelos y herramientas para la evaluación computacional de la toxicidad acuática (aguda y crónica) de productos químicos utilizados y producidos por las industrias farmacéutica y cosmética, como los mencionados API, solventes eutécticos, líquidos iónicos, etc.

Primero, obtuvimos la lista de medicamentos y cosméticos comercializados (8.282 compuestos químicos en total), y los datos experimentales asociados: toxicidad acuática aguda y crónica, biodegradación y bioacumulación. Estos datos se recopilaron de diferentes fuentes, incluidos artículos científicos y bases de datos públicas de toxicidad (ECOTOX, Aquatic ECETOC, Aquatic Japan MoE, Aquatic OASIS, FoodTOX Hazard EFSA). La información recopilada incluía no sólo la estructura química y los datos de respuesta a la toxicidad, sino también condiciones/parámetros experimentales. La demanda bioquímica de oxígeno (BOD) y el factor de bioconcentración (BCF) se utilizaron como parámetros de respuesta para representar las propiedades de biodegradación y bioacumulación. Su determinación era importante ya que los productos químicos que no son biodegradables ni/o bioacumulativos pueden causar efectos crónicos, y por lo tanto estas propiedades nos ayudan a decidir si es necesario determinar la toxicidad a largo plazo de un producto químico (si un

compuesto es rápidamente degradable/no bioacumulativo, entonces hay poca o ninguna probabilidad de que muestre toxicidad crónica).

Se desarrollaron varios modelos QSAR del tipo “multitarea”, que emplean enfoques de aprendizaje automatizado para comprender las características estructurales responsables de la toxicidad acuática en función de las condiciones de experimentación (ver Figura 3). Por lo tanto, al usar un modelo QSAR multitarea, el usuario tiene la flexibilidad de obtener predicciones de acuerdo con las condiciones experimentales establecidas<sup>17</sup>.



**Figura 3.-** Estrategia QSAR multitarea seguida en el proyecto EcoCosmePharm para la evaluación de toxicidad de componentes químicos vertidos al medio acuático por las industrias cosmética y farmacéutica.

El conocimiento obtenido del estudio nos ayudó a clasificar los productos farmacéuticos y cosméticos comercializados existentes en grupos de compuestos muy tóxicos, tóxicos, poco tóxicos e inocuos. Esta clasificación nos permite identificar sustancias químicas alternativas o diseñar nuevos análogos que puedan mostrar propiedades fisicoquímicas deseables similares, con menor o nula ecotoxicidad.

Cabe destacar que, también en este caso, se procedió a realizar una validación experimental de los modelos computacionales. Se realizaron estudios en una cincuentena de productos químicos probados en *Daphnia magna* (en colaboración con la empresa Xenobiotics SL, <https://xenobiotics.es>), que mostraron un alto porcentaje de concordancia con las predicciones de grupos de toxicidad de los compuestos por los QSARs. Una quincena de estos compuestos se probó también en peces de la especie *Oncorhynchus mykiss* en el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA, <https://www.inia.es/Pages/Home.aspx>). En este caso la clasificación en cuatro grupos

distintos no fue posible –dada la menor cantidad de compuestos ensayados–, pero sí se demostró una buena capacidad de los modelos en separar los compuestos tóxicos de los que no lo eran.

Finalmente, como resultado del proyecto EcoCosmePharm también se está terminando de implementar una plataforma web en línea interactiva y fácil de usar, que permita predecir la toxicidad acuática para cualquier producto químico o conjunto de productos químicos de consulta. Además de su simpleza e interactividad, esta herramienta generará informes de toxicidad detallados para los usuarios, y esperamos que se utilice para evaluar compuestos incluso antes de su registro y aprobación.

## CONSIDERACIONES FINALES

Los proyectos COMBASE y EcoCosmePharm han abordado la problemática de la contaminación acuática, y han consistido en el desarrollo de modelos computacionales utilizando información disponible sobre biocidas aprobados o bajo revisión y sustancias contaminantes provenientes de las industrias farmacéutica y cosmética. La información recopilada de las bases de datos existentes se ha complementado con validaciones experimentales para diferentes niveles tróficos representativos del compartimento acuático, que contribuyen a aumentar así el grado de confianza que puede depositarse en los métodos computacionales. Este enfoque muestra además el interés en el trabajo conjunto de las tres estrategias (*in vitro*, *in vivo* e *in silico*), y cómo pueden utilizarse de forma complementaria de una forma respetuosa tanto con el concepto de las 3Rs como con las normativas reguladoras existentes.

COMBASE y EcoCosmePharm han sido proyectos altamente innovadores, en los que se han integrado bases de datos con información ecotoxicológica específica y modelos computacionales QSAR validados experimentalmente para confirmar su eficacia y validez regulatoria, todo ello empaquetado en forma de plataformas de fácil uso por personal no necesariamente especializado. Los dos proyectos contribuyen directamente a la promoción del uso generalizado de métodos computacionales. El impacto ambiental de las plataformas tecnológicas resultantes está relacionado con la minimización de los efectos de las sustancias tóxicas en el ecosistema asociado al mayor uso de productos más sostenibles y, por tanto, a la reducción de las emisiones de sustancias químicas peligrosas para el medio ambiente. Desde una perspectiva económica, el uso de métodos *in silico* tiene un impacto en los costes asociados a las pruebas de productos químicos.

# MÉTODOS ALTERNATIVOS

Esperamos que COMBASE y EcoCosmePharm puedan servir de inspiración para el desarrollo de futuras nuevas herramientas basadas en toxicología computacional, cuyo objetivo sean nuevos grupos de compuestos químicos, y esperamos también que sirvan de ayuda a los legisladores y a la industria a ser más conscientes del riesgo potencial de algunos productos químicos y a elegir los más eficaces y seguros.

## AGRADECIMIENTOS

Los proyectos citados en este trabajo han sido desarrollados gracias a las ayudas siguientes:

- [COMBASE](#): programa LIFE+ (LIFE15 ENV/ES/000416).
- [EcoCosmePharm](#): programa Marie Skłodowska-Curie (Grant agreement number 845373).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Giri S. *Water quality prospective in Twenty First Century: Status of water quality in major river basins, contemporary strategies and impediments: A review*. Environ Pollut. 2021;271:116332.
2. European Commission (2006) Regulation (EC) No 1907/2006 of The European Parliament and The Council of 18 December 2006. Off J Eur Union Lett 396:1-849.
3. European Commission (2020). 2019 report on the statistics on the use of animals for scientific purposes in the Member States of the European Union in 2015-2017. COM/2020/16 final.
4. Sharma S and Sharma D. *Intelligently applying artificial intelligence in chemoinformatics*. Curr Top Med Chem. 2018;18:1804-1826.
5. Ciallella HL and Zhu H. *Advancing computational toxicology in the Big Data era by artificial intelligence: data-driven and mechanism-driven modeling for chemical toxicity*. Chem Res Toxicol. 2019, 32:536-547.
6. Gramatica P. *On the development and validation of QSAR models*. Methods Mol Biol. 2013;930:499-526.
7. Doytchinova I. *Drug Design-Past, Present, Future*. Molecules. 2022;27(5):1496.
8. Madden JC and Thompson CV. *Pharmacokinetic Tools and Applications*. Methods Mol Biol. 2022;2425:57-83.
9. Vinken M, Benfenati E, Busquet F, et al. *Safer chemicals using less animals: kick-off of the European ONTOX project*. Toxicology. 2021;458:152846.
10. Barigye SJ, Gómez-Ganau S, Serrano-Candelas E, et al. *PeptiDesCalculator: Software for computation of peptide descriptors. Definition, implementation and case studies for 9 bioactivity endpoints*. Proteins. 2021;89(2):174-184.
11. Ambure P, Ballesteros A, Huertas F, et al. *Development of generalized QSAR models for predicting cytotoxicity and genotoxicity of metal oxides nanoparticles*. International Journal of Quantitative Structure-Property Relationships (IJQSPR). 2020;5(4):83-100.
12. Gozalbes R, de Julián-Ortiz JV, and Fito-López C. *Métodos computacionales en toxicología predictiva: aplicación a la reducción de ensayos con animales en el contexto de la legislación comunitaria REACH*. Rev. Toxicol. 2014;31:157-167.
13. ECHA (2014). Transitional Guidance on Regulation (EU) No 528/2012 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products (Biocidal Products Regulation, the BPR). European Chemicals Agency, Helsinki, Finland, May 2014.
14. Guidance document on the validation of (Quantitative) Structure-Activity Relationships [(Q)SAR] models. OECD Environment Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 69, Paris 2007, (www.oecd.org/ehs/).
15. Brausch JM, Connors KA, Brooks BW, et al. *Human pharmaceuticals in the aquatic environment: A review of recent toxicological studies and considerations for toxicity testing*. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. 2012;218:1-99.
16. Wilkinson JL, Boxall ABA, Kolpin DW, et al. *Pharmaceutical pollution of the world's rivers*. Proc Natl Acad Sci USA. 2022;119(8):e2113947119.
17. Ambure P, Halder AK, González-Díaz H, et al. *QSAR-Co: An open source software for developing robust multitasking or multitarget classification-based QSAR models*. J Chem Inf Model. 2019;59(6): 2538-2544.

## Desarrollo de una escala de expresión facial en cerdas usando el parto como modelo de dolor

Eva Mainau<sup>1</sup>, Elena Navarro<sup>2</sup> y Xavier Manteca<sup>2</sup>

<sup>1</sup>AWECC Advisors SL, Ed. Eureka, Parc de la Recerca de la UAB

<sup>2</sup>Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Autònoma de Barcelona

**Palabras clave:** porcino, expresión, comportamiento.

### INTRODUCCIÓN

El dolor es una experiencia sensorial y emocional que tiene efectos negativos sobre el bienestar animal y la producción en animales de granja. La medición del dolor en animales es muy compleja, y sigue siendo un tema de interés en la atención veterinaria y la investigación biomédica. La evaluación del dolor en animales se basa en la utilización de cuatro tipos de indicadores: medidas basadas en los índices productivos, indicadores fisiológicos y de comportamiento y, recientemente, las expresiones faciales. Las escalas de dolor basadas en las expresiones faciales, conocidas como *Grimace Scales* fueron descritas por primera vez en humanos por Ekman y Friesen (1978). En los últimos años, se han desarrollado en diferentes especies tales como roedores, conejos, ovejas, caballos, hurones, burros, focas y lechones. A pesar de esto, hasta la fecha, no existe una escala de dolor basada en expresiones faciales en cerdas o cerdos adultos. El desarrollo y la aplicación de estas escalas requieren la habilidad de identificar cambios en las regiones faciales conocidas como *Facial Action Units* (FAUs) cuando los animales están experimentando dolor. Las expresiones faciales han resultado ser una herramienta útil no solo para identificar el dolor, sino también para evaluar su intensidad. En cada especie, y según su morfología, se pueden analizar y distinguir unas regiones u otras indicativas de dolor.

El objetivo de este estudio fue desarrollar una escala de expresión facial basada en las FAUs en cerdas, utilizando el parto como modelo de dolor fisiológico. Al igual que en otras especies, se ha demostrado que el parto en sí mismo es un momento doloroso para las cerdas. Un parto difícil puede afectar el comportamiento de la cerda a través del agotamiento, la enfermedad o el dolor. El dolor en el parto en cerdas conlleva un comportamiento maternal deficiente y pérdidas económicas debido a una disminución de la

producción (por ejemplo, aumentando el número de lechones muertos alrededor del parto).

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### Animales y obtención de las imágenes

Un total de 21 cerdas Danbred (7 primerizas y 14 múltiparas) fueron seleccionadas el día del parto. Las cerdas estaban alojadas en jaulas de maternidad (1,95 x 0,60 m) instaladas en corrales de parideras (2,40 x 1,80 m). Se instaló una cámara (SK8 HD 4K; SK8 Urban, España) a 1,20 m por encima del suelo sujeta a la jaula de maternidad para cada una de las cerdas estudiadas. La cámara enfocaba la cara de la cerda y su ángulo permitía registrar el resto del cuerpo (ver Figura 1). Se obtuvieron grabaciones de video durante todo el parto, así como antes del destete (19 días postparto).



Imagen suministrada por la autoría

**Figura 1.-** Visión de las imágenes obtenidas en granja. Para observar la cara de las cerdas en todo momento, se instaló una barrera metálica vertical frente al comedero, para evitar que la cerda metiera la cabeza debajo de éste.

# BIENESTAR ANIMAL

Para cada cerda, se registraron los siguientes parámetros durante el parto mediante observaciones directas: la duración del parto (período de tiempo entre el nacimiento del primer y el último lechón), el momento de expulsión de cada lechón, la condición de cada lechón al nacer (nacido vivo, muerto o momificado) y el número de tratamientos e intervenciones manuales durante el parto.

Un observador visualizó todos los videos (parto y predestete) y seleccionó un total de 268 imágenes en tres momentos diferentes focalizando únicamente la cara de la cerda mientras estaba echada lateralmente:

1. Predestete: momento indoloro (puntuación 0; 78 imágenes).
2. Parto: tiempo de intervalo entre la expulsión de dos lechones. Dolor moderado (puntuación 1; 91 imágenes).
3. Parto: durante la expulsión de los lechones. Dolor intenso (puntuación 2; 99 imágenes).

## Obtención de la escala

Un mismo observador analizó las 268 imágenes (Silver Standard; SS) previamente seleccionadas de una forma aleatoria y ciega. Para cada imagen, el SS evaluó cinco FAUs potenciales: tensión sobre los ojos, ángulo del hocico, tensión del cuello, tensión del temporal y posición de las orejas, y tensión de los maseteros. La evaluación del grado de dolor para cada FAU fue: puntuación 0 = indoloro, puntuación 1 = dolor moderado y puntuación 2 = dolor severo. Cuando el SS no era capaz de asignar una puntuación del grado de dolor, lo registraba como IDK (no lo sé, del inglés *I Don't Know*).

A posteriori, un grupo de 8 observadores que trabajan como investigadores en el campo del comportamiento y el bienestar

animal en la Universitat Autònoma de Barcelona, sin experiencia en la evaluación de expresiones faciales, fueron convocados para una sesión de entrenamiento y repetibilidad. Cuatro observadores (1 hombre y 3 mujeres) suelen trabajar en la especie porcina, mientras que los otros 4 (1 hombre y 3 mujeres) trabajan en otras especies (bovino, animales de compañía y de zoológico). La sesión de entrenamiento (de 45 minutos de duración) fue realizada por el SS explicando las diferencias físicas en las expresiones faciales de las cerdas entre los tres momentos anteriormente descritos. A posteriori, los observadores evaluaron 60 imágenes elegidas aleatoriamente de las 268 imágenes inicialmente seleccionadas (18 imágenes con puntuación 0; 20 imágenes con puntuación 1 y 22 imágenes con puntuación 2). Los observadores tenían 45 segundos para observar cada una de las imágenes y evaluar para cada FAU el grado de dolor: 0 (sin dolor), 1 (dolor moderado), 2 (dolor intenso) o IDK (no lo sé, del inglés *I Don't Know*).

Los datos se analizaron utilizando el SAS 9.4 y se estableció un valor de significancia del 0,05. Se usó el coeficiente Kappa de Cohen (K) para estudiar la concordancia entre las evaluaciones del SS y el momento en que se obtuvo cada imagen, así como la repetibilidad entre observadores. Además, se estudió, el efecto del género del observador (mujer vs hombre) y su experiencia en el comportamiento de los cerdos (si vs no) en las puntuaciones obtenidas, mediante un procedimiento de GLIMMIX.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Obtención de la escala

La Figura 2 muestra la escala de expresiones faciales propuesta en cerdas, usando el parto como modelo de dolor fisiológico. Para determinar en qué grado de dolor se encuentra la cerda, al menos una de las descripciones de cada zona debe observarse claramente.

## Tensión sobre los ojos



- Ojos cerrados.
- Párpados relajados.



- Ojos cerrados o entreabiertos mirando hacia delante o lateralmente.
- Párpados ligeramente curvados.



- Ojos abiertos mirando hacia el hocico, esclerótica visible.
- Párpados curvados.

## Ángulo del hocico



- Hocico relajado, sin forzar.
- Parte final del hocico sin tensión y en su posición natural.



- Hocico ligeramente contraído.
- Parte final del hocico elevada.



- Hocico alargado.
- Parte final del hocico hacia delante.

## Tensión del cuello



- Cuello relajado, siguiendo su posición corporal.
- Papada visible.



- Cuello estirado, sin tensión.
- Generalmente papada visible.



- Cuello muy estirado.
- Papada estirada, incluso ausente.

# BIENESTAR ANIMAL

## Tensión del temporal y posición de las orejas



- Músculo temporal relajado.
- Frente cóncava.
- Orejas orientadas hacia delante.



- Músculo temporal parcialmente tenso.
- Frente recta.
- Orejas orientadas hacia los lados.



- Músculo temporal tenso.
- Frente ligeramente convexa.
- Orejas orientadas hacia atrás.

## Tensión de los maseteros



- Maseteros redondeados por la parte inferior.
- Maseteros claramente visibles, con volumen.



- Maseteros presentes y un poco redondeados por la parte inferior.



- Maseteros alargados y poco o nada visibles.

Imagen suministrada por la autoría

**Figura 2.-** Escala de expresiones faciales en cerdas, con la descripción de cada una de las cinco unidades de acción facial (FAUs) empleadas: tensión sobre los ojos, ángulo del hocico, tensión del cuello, tensión del temporal y posición de las orejas, y tensión de los maseteros. Las FAUs se clasifican en base a una escala de tres grados: puntuación 0 = sin dolor; puntuación 1 = dolor moderado y puntuación 2 = dolor intenso.

Cuatro de las cinco regiones identificadas en la escala de dolor basada en las expresiones faciales de las cerdas se utilizan para evaluar el dolor en otras especies (ojos, hocico, maseteros y zona temporal y orejas). La región del cuello, en cambio, no había sido descrita previamente en otras especies, probablemente debido a que la mayoría de las escalas basadas en expresiones faciales evalúan la cabeza del animal en una posición frontal. En el caso de las cerdas alrededor del parto, se incluyó esta zona básicamente por dos motivos: (1) las imágenes en cerdas alrededor del parto se obtuvieron en posición lateral, ya que las cerdas permanecen más

del 85% del tiempo en dicha postura durante el parto y (2) se observó que, en función de la posición del cuello, la expresión facial cambia.

Más del 80% de las imágenes fueron clasificadas por el SS como dolor intenso cuando se obtuvieron durante la expulsión del lechón, y como dolor moderado durante el intervalo de tiempo entre la expulsión de dos lechones. Estos resultados están de acuerdo con Ison y col. (2018), quienes pudieron evaluar la intensidad del dolor alrededor del parto en estas dos fases

(expulsión del lechón e intervalo entre la expulsión de dos lechones) a través de la presencia y frecuencia de indicadores de dolor corporales en las cerdas (estirar la pata trasera presionando el abdomen, arquear la espalda, empujar las patas delanteras hacia delante, temblar y mover la cola). De hecho, se obtuvo una alta concordancia entre la evaluación del SS de las cinco FAUs y el momento cuando se obtuvo cada imagen (predestete, tiempo de intervalo entre la expulsión de dos lechones o expulsión de un lechón). Se obtuvo una muy buena concordancia para las FAUs tensión sobre los ojos ( $K=0,90$ ) y ángulo del hocico ( $K=0,85$ ) y una buena concordancia para las FAUs tensión del cuello ( $K=0,74$ ), tensión del temporal y posición de las orejas ( $K=0,63$ ) y tensión de los maseteros ( $K=0,71$ ).

La región facial que presentó una mayor concordancia fue la tensión sobre los ojos. Esto también ocurre en muchas de las especies ya descritas. La tensión sobre los ojos no solo evalúa la apertura de los ojos, sino también los párpados, las cejas y su expresión. Destacamos que las demás escalas de dolor basadas en expresiones faciales describen que un animal experimenta más dolor cuanto más cierra los ojos. Sin embargo, las cerdas que experimentan dolor en el parto abren por completo los ojos, mostrando parcialmente la esclerótica, hecho que también se describe en la escala de dolor basada en las expresiones faciales en lechones.

### Repetibilidad entre observadores

Se obtuvo una buena concordancia en la tensión sobre los ojos ( $K=0,63$ ), mientras que las otras FAUs, obtuvieron una concordancia moderada ( $K=0,36-0,45$ ) en el estudio de la repetibilidad entre observadores. Se concluyó que la tensión sobre los ojos y la región de los maseteros son las zonas más sencillas a la hora de detectar los cambios faciales debidos al dolor. Los maseteros también se categorizan como una región fácil de determinar en otras especies como las ovejas, los ratones, los conejos y los hurones, pero a diferencia de lo que sucede en las cerdas (cuanto más dolor, mayor es el estiramiento de los maseteros), al resto de especies se les abultan los maseteros al sentir dolor. Cabe decir que, en las ratas y los lechones, el dolor evidenciado por los maseteros se evalúa de la misma forma que en las cerdas, abultándose cuando los animales están relajados y estirándose cuando sufren dolor.

Las mujeres obtuvieron una mayor concordancia con el SS que los hombres ( $K=0,47$  y  $0,38$ , respectivamente). Además, las mujeres puntuaron un mayor porcentaje de imágenes como dolor más intenso que los hombres en las FAUs de tensión de los maseteros,

el ángulo del hocico y la tensión del cuello. Previamente, se ha descrito que las mujeres muestran una mayor empatía en la evaluación del dolor en animales y humanos.

Finalmente, la experiencia y los conocimientos previos en el comportamiento de los cerdos no influyeron en los resultados de concordancia con el SS, ni tampoco en el grado de puntuación otorgado en los momentos dolorosos. Así pues, un breve periodo de entrenamiento fue suficiente para asegurar una correcta evaluación de los cambios en las expresiones faciales en cerdas, así como la intensidad del dolor sufrido. En consecuencia, la presente escala es fácil de aprender y podría aplicarse fácilmente en el campo por veterinarios y ganaderos, independientemente de su experiencia previa.

### CONCLUSIONES

Se ha desarrollado una escala de dolor basada en las expresiones faciales de las cerdas alrededor del parto. La escala tiene en cuenta cinco regiones faciales (ojos, hocico, maseteros, región temporal y orejas y cuello) y tres intensidades de dolor (previo al destete, intervalo entre la expulsión de dos lechones y expulsión de un lechón). La escala de dolor basada en expresiones faciales en cerdas representa un avance en el reconocimiento y manejo del dolor y puede convertirse en una herramienta rápida, fácil de aprender y altamente reproducible para las cerdas en maternidad. Futuros estudios contemplan la aplicación de esta herramienta en otras situaciones de dolor de las cerdas o cerdos adultos tales como las cojeras, así como la validación de la escala mediante la correlación con otros indicadores de comportamiento y fisiológicos de dolor y/o la administración de analgesia.

### BIBLIOGRAFÍA

- Costa ED, Miner M, Lebelt D, et al. *Development of the Horse Grimace Scale (HGS) as a Pain Assessment Tool in Horses Undergoing Routine Castration*. PLoS ONE. 2014;9:e92281.
- Di Giminiani P, Brierley VLMH, Scollo A, et al. *The Assessment of Facial Expressions in Piglets Undergoing Tail Docking and Castration: Toward the Development of the Piglet Grimace Scale*. Frontiers in Veterinary Science. 2016;3:100.
- Duarte MIF, Raposo MLB, Rodrigues PJF, et al. *Measuring empathy in medical students, gender differences and level of medical education: An identification of a taxonomy of students*. Investigación en Educación Médica. 2016;5:253-260.
- Ekman P, Friesen WV. *Facial action coding system: investigator's guide*. Consulting Psychologists Press: Palo Alto, CA, USA. 1978.

# BIENESTAR ANIMAL

- Graça J, Calheiros MM, Oliveira A, et al. *Why are women less likely to support animal exploitation than men? The mediating roles of social dominance orientation and empathy.* Personality and Individual Differences. 2018;129:66-69.
- Guesgen M, Beausoleil N, Leach M, et al. *Coding and quantification of a facial expression for pain in lambs.* Behavioural Processes. 2016;132:49-56.
- Häger C, Biernot S, Buettner M, et al. *The Sheep Grimace Scale as an indicator of post-operative distress and pain in laboratory sheep.* PLoS ONE. 2017;12:e0175839.
- Huxley JN and Whay HR. *Current attitudes of cattle practitioners to pain and the use of analgesics in cattle.* Veterinary Record. 2006;159:662-668.
- Ison SH, Jarvis S, Hall SA, et al. *Periparturient behavior and physiology: Further insight into the farrowing process for primiparous and multiparous sows.* Frontiers in Veterinary Science. 2018;5:5.
- Keating SCJ, Thomas A, Flecknell PA, et al. *Evaluation of EMLA cream for preventing pain during tattooing of rabbits: changes in physiological, behavioural and facial expression responses.* PLoS ONE. 2012;7:e44437.
- Langford DJ, Bailey AL, Chanda ML, et al. *Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse.* Nature Methods. 2010;7:447-449.
- Macrae AM, Makowska IJ, and Fraser D. *Initial evaluation of facial expressions and behaviours of harbour seal pups (Phocavitulina) in response to tagging and microchipping.* Applied Animal Behaviour Science. 2018;205:167-174.
- Mainau E, Dalmau A, Ruiz-de-la-Torre JL, et al. *Validation of an automatic system to detect position changes in puerperal sows.* Applied Animal Behaviour Science. 2009;121:96-102.
- Mainau E and Manteca X. *Pain and discomfort caused by parturition in cows and sows.* Applied Animal Behaviour Science. 2011;135:241-251.
- Mainau E, Temple D, and Manteca X. *Experimental study on the effect of oral meloxicam administration in sows on pre-weaning mortality and growth and immunoglobulin G transfer to piglets.* Preventive in Veterinary Medicine. 2016;126:48-52.
- McLennan KM. *Why pain is still a welfare issue for farm animals, and how facial expression could be the answer.* Agriculture. 2018;8:127.
- McLennan KM, Rebelo CJB, Corke MJ, et al. *Development of a facial expression scale using footrot and mastitis as models of pain in sheep.* Applied Animal Behaviour Science. 2016;176:19-26.
- Mogil JS, Pang DS, Dutra GGS, et al. *The development and use of facial grimace scales for pain measurement in animals.* Neuroscience & Biobehavioural Reviews. 2020;116:480-493.
- Orth EK, González FJN, Pastrana CI, et al. *Development of a donkey grimace scale to recognize pain in donkeys (Equus asinus) post castration.* Animals. 2020;10:1411.
- Reijgwart ML, Schoemaker NJ, Pascuzzo R, et al. *The composition and initial evaluation of a grimace scale in ferrets after surgical implantation of a telemetry probe.* PLoS ONE. 2017;12:e0187986.
- Sotocinal SG, Sorge RE, Zaloum A, et al. *The Rat Grimace Scale: A partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions.* Molecular Pain. 2011;7:55.
- Thorsen CK, Schild S-LA, Rangstrup-Christensen L, et al. *The effect of farrowing duration on maternal behavior of hyperprolific sows in organic outdoor production.* Livestock Science. 2017;204:92-97.
- Viscardi AV, Hunniford M, Lawlis P, et al. *Development of a Piglet Grimace Scale to evaluate piglet pain using facial expressions following castration and tail docking: a pilot study.* Frontiers in Veterinary Science. 2017;4:51.
- Weary DM, Niel L, Flower FC, et al. *Identifying and preventing pain in animals.* Applied Animal Behaviour Science. 2006;100:64-76.

## Histología de la porción distal del aparato digestivo y del hígado de las aves de corral

Ana Isabel Nieto<sup>1,2</sup>, Inmaculada Ramírez de Arellano<sup>3</sup>, Carlos Millán<sup>3</sup> y Manuel Pablo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Anapath Granada SL

<sup>2</sup>Universidad de Granada

<sup>3</sup>ImasdeAgroalimentaria SL

**Palabras clave:** ave, aparato digestivo, enterocitos.

### INTRODUCCIÓN

El uso de las aves en experimentación animal, a diferencia de lo ocurrido con otras especies, ha ido creciendo año tras año. Así, según el último informe estadístico publicado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación con los datos referidos al año 2020, se han utilizado algo más de 129.000 aves de corral y 6.200 de otras aves en proyectos científicos<sup>1</sup>. Esto supone un aumento de un 25% con respecto al año 2019 y casi un 40% con respecto al año 2018. Las causas de este incremento –según este mismo informe– hay que achacarlas a: estudios nutricionales, ensayos para valorar la potencia y seguridad de lotes de medicamentos de uso veterinario, y estudios financiados por la Unión Europea sobre el bienestar de las aves de corral y las gallinas ponedoras.

En los últimos 30 años, el sector de las aves de corral ha ofrecido el mayor crecimiento en producción animal. Las mejoras genéticas, el conocimiento de los requisitos nutricionales, el cambio en el uso de antibióticos, el comercio global de ingredientes, así como una fuente de proteínas económica y accesible para los seres humanos, ha incentivado a la industria avícola hacia la investigación<sup>2</sup>.

Patologías como la coccidiosis o las enteritis necróticas bacterianas siguen teniendo una alta prevalencia, pero hoy en día es necesario renovar las prácticas de producción para depender menos de los medicamentos, sobre todo de los antibióticos<sup>3</sup>. Además, el incremento de los costes en la materia prima de los piensos ha hecho necesario buscar nuevas fuentes de proteínas y carbohidratos con los que alimentar a las aves, manteniendo la rentabilidad de las explotaciones. De esta manera, son numerosos los proyectos en los que se analiza la digestibilidad de las dietas, y como parte de los procedimientos, se realizan estudios histológicos del tracto digestivo que incluyen valoraciones

histomorfométricas de longitud y grosor de vellosidades intestinales<sup>4</sup> (ver Figura 1A).

Por ello y aunque las aves de corral pueden resultar una especie alejada para muchos de los lectores de esta revista, hemos decidido realizar una revisión histológica del tracto digestivo de las aves usando como modelo la especie *Gallus gallus* (ver Figura 1B), ensalzando la especial relevancia que tiene el tracto digestivo a la hora de combatir enfermedades, cuya vía de entrada principal son los enterocitos de la pared intestinal.

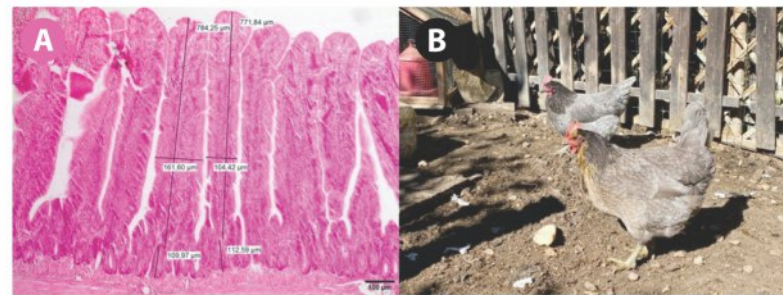


Imagen suministrada por la autoría

**Figura 1.-** A. Ejemplo de mediciones de la longitud y grosor de la vellosidad y profundidad de las criptas. B. Gallinas ponedoras de la autoría.

### MATERIAL Y METODOS

Para este estudio histológico, se recogieron muestras del tracto intestinal de pollos de entre 28 y 42 días de edad; en los que además se realizaron otros estudios relacionados con la salud digestiva de las aves, como puede ser al estudio de la microbiota intestinal, la viscosidad del contenido digestivo o la expresión génica (ARNm) de determinadas proteínas relacionadas con la respuesta inmune de los animales.

# HISTOPATOLOGÍA

Muestras procedentes de estómago, proventrículo, molleja, duodeno, yeyuno, íleon, ciego y colon fueron fijadas en formol tamponado, junto con otras muestras de hígado, corazón y riñón (aunque sólo incluiremos en esta revisión el hígado).

Las muestras se procesaron de forma rutinaria hasta su inclusión en bloques de parafina. Tras los cortes, se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina (HE) y Tricrómico de Masson (TCM). En algunas muestras de intestino, se realizaron mediciones de la longitud y grosor de las vellosidades, la profundidad de las criptas, la relación entre la longitud de vellosidades y la profundidad de las criptas y el número de células caliciformes por campo de 40 aumentos.

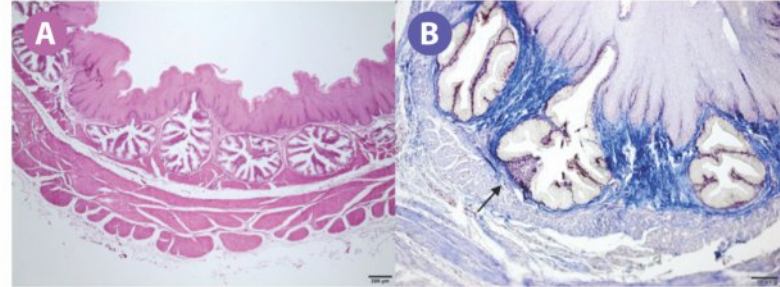
## RESULTADOS HISTOLÓGICOS

### Esófago y buche

El esófago de las aves es más largo que el de los mamíferos y, a diferencia de estos, está situado a la derecha de la tráquea, presentando una dilatación denominada buche justo antes de la entrada a la cavidad torácica, dividiendo al esófago en una porción cervical y una porción torácica. La forma del buche varía entre las especies de aves, pudiendo ser bilateral como en el caso de las palomas o inexistente como en gaviotas o búhos<sup>5</sup>.

Histológicamente, el esófago presenta las mismas capas que el resto del tubo digestivo: mucosa, submucosa, muscular y serosa o adventicia<sup>6</sup>. La túnica mucosa presenta pliegues longitudinales y un epitelio plano estratificado que en el caso de las gallinas es no queratinizado. La lámina propia de la mucosa incluye glándulas de tipo mucoso. Su función es lubricar el alimento que pasa por allí, siendo más abundantes en la parte craneal (ver Figura 2), y ofreciendo una estructura tubuloalveolar hundiéndose en la parte más profunda de la lámina propia (ver Figura 2B). En esta lámina propia, también podemos encontrar tejido linfoides nodular o tonsilas esofágicas<sup>6</sup>. La capa muscular de la mucosa es una capa continua, pero poco desarrollada, formada por uno o dos haces de fibras musculares lisas. La submucosa, aunque es muy delgada, presenta tejido conjuntivo más denso que la lámina propia y se continúa externamente con una túnica muscular muy desarrollada. Esta última está dividida en una capa interna en la que las fibras de músculo liso se disponen en dirección circular, y una capa externa con disposición longitudinal (ver Figura 2A). La túnica más externa es la serosa, formada por tejido conjuntivo laxo y donde se encuentran los vasos y los nervios.

La estructura histológica del buche es similar a la del esófago, pero con menos glándulas o incluso carentes de ellas como en las gallinas (imágenes no mostradas).



**Figura 2.**- Esófago de gallina. Se observa el epitelio estratificado no queratinizado de la mucosa, la presencia de glándulas tubuloalveolares en la lámina propia y las capas circular y longitudinal de la túnica muscular. **A.** Hematoxilina-eosina. **B.** Tricrómico de Masson. Se observan algunas formaciones linfoides entre las glándulas (flecha).

### Estómago

El estómago se compone de dos partes: el estómago glandular o proventrículo, y el estómago muscular o molleja. En el primero, el alimento va a recibir la secreción de las glándulas situadas en su capa mucosa y se va a realizar la digestión química; mientras que en el segundo, se realiza el 'molido' del alimento, especialmente cuando se trata de grano<sup>5,6</sup>.

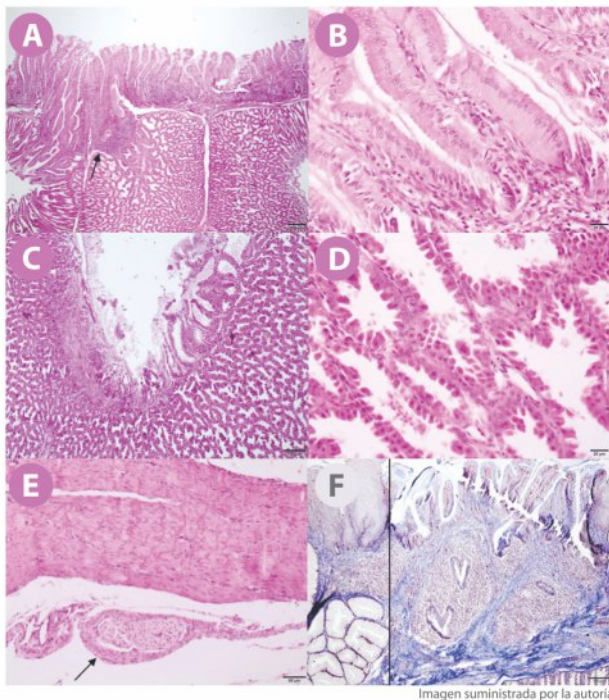
El estómago glandular o proventrículo es la continuación del esófago sin una separación clara. En su capa mucosa presenta un epitelio cilíndrico simple con numerosos pliegues, entre los que aparecen surcos (ver Figura 3) para las glándulas proventriculares superficiales. Las células tienen un núcleo en posición basal, mientras que la parte apical la ocupan vacuolas de mucina (ver Figura 3B). En la lámina propia se observan las glándulas proventriculares profundas, que algunos autores consideran que son los propios pliegues del epitelio de la mucosa invaginándose hacia el fondo de esta capa, y que están rodeados de la muscular de la mucosa<sup>5</sup>. Se organizan en forma de lóbulos, con ramificaciones de células, de manera que la secreción de éstas desemboca por el conducto terciario hacia el centro de la glándula, en lo que constituiría el conducto secundario. A través de los conductos primarios, la secreción se dirigiría hacia la luz del proventrículo (ver Figura 3C). Estas estructuras hacen que macroscópicamente el órgano parezca un tejido esponjoso.

El epitelio de las glándulas se encuentra formado por las células denominadas oxintopépticas (con un citoplasma intensamente eosinófilo por su elevado contenido en enzimas) que producen tanto ácido clorhídrico como pepsina y se unen sólo por la parte más basal a la lámina propia, permitiendo liberar enzimas tanto por la parte apical como por las laterales (ver Figura 3D). El epitelio,

además, presenta células endocrinas que producen hormonas gástricas.

En la lámina propia del proventrículo se observa tejido linfoide como también lo había en el esófago. Se trata de formaciones sólidas nodulares cuya principal función es la defensa del epitelio como en los mamíferos (ver Figura 3A). En la submucosa nos podemos encontrar los plexos nerviosos de Meisner y vasos. La túnica muscular, al igual que el esófago, también está bien desarrollada, con la presencia de una capa interna circular y una externa longitudinal y los plexos nerviosos mientéricos o de Auerbach (responsables de los movimientos peristálticos) entre las dos capas (ver Figura 3E). Externamente lo recubre la capa serosa que se continúa con el saco peritoneal.

Un istmo separa el proventrículo de la molleja, desapareciendo bruscamente las glándulas.



**Figura 3.-**Estómago glandular o proventrículo. **A.** Mucosa del proventrículo, la flecha indica las formaciones linfoides de la mucosa. **B.** Células del epitelio de la mucosa. **C.** Conducto terciario de la glándula proventricular profunda donde las células oxintopépticas vierten el contenido. **D.** Células oxintopépticas. **E.** Túnica muscular y serosa con el plexo nervioso de Auerbach (flecha). **F.** Tinción TCM. Zona de transición entre estómago (izquierda de la línea) y proventrículo (derecha de la línea) con presencia de formaciones linfoides en lámina propia.

El estómago muscular o molleja está especialmente desarrollado en aves granívoras como las gallinas, y se situada entre los lóbulos del hígado. Puede contener pequeñas piedras que ayudan a moler el grano (gastrolitos).

En la mucosa se observa un epitelio de revestimiento que forma pliegues y cuyas células presentan vacuolas de mucina en su parte apical, que a veces, se proyectan hacia la luz (ver Figura 4). En la parte basal de los pliegues se encuentran las glándulas tubulares simples de la molleja que se extienden hacia la lámina propia. Estas glándulas poseen dos tipos de células: las principales, que forman la mayor parte de la glándula, y las basales, que se encuentran en el fundus. Las células basales tienen una forma cuboidal y un citoplasma que se tiñe poco, funcionando como 'células madre'. Las principales, sin embargo, son más cuboidales o columnares bajas y se van aplanando a medida que ascienden en la pared de la glándula. El citoplasma es intensamente basófilo en las más profundas, ya que poseen gran cantidad de retículo endoplásmico. En la parte superior de las glándulas presentan gránulos eosinófilos de koilina, una glicoproteína sintetizada por ellas que va a formar parte de la cutícula. Cuando estas células se desprenden de la pared y se degradan, la koilina se deposita entre las células de las glándulas en forma de láminas verticales y en capas horizontales, junto con detritus celulares en la parte superficial de la mucosa (ver Figuras 4A y 4B). Se trata de un material en principio blando que al contactar con el ácido clorhídrico del proventrículo se endurece y protege la pared, a la vez que ayuda a la digestión.

La submucosa actúa de conexión entre los componentes del tejido conjuntivo de la lámina propia de la mucosa con la túnica muscular. Esta es la túnica más desarrollada de la molleja. Está formada a su vez por tres capas, una longitudinal externa, una circular media y una interna oblicua, todas ellas de músculo liso (ver Figura 4D). Entre ellas pueden aparecer vasos y el plexo nervioso mientérico.

En la zona de transición con el duodeno, denominada unión ventrículo-duodenal o ostium pyloricum, el grosor de la capa muscular disminuye y reaparece la muscular de la mucosa que no existía en la molleja. En esta zona, la mucosa contiene numerosas células endocrinas productoras de hormonas<sup>6</sup>.

# HISTOPATOLOGÍA

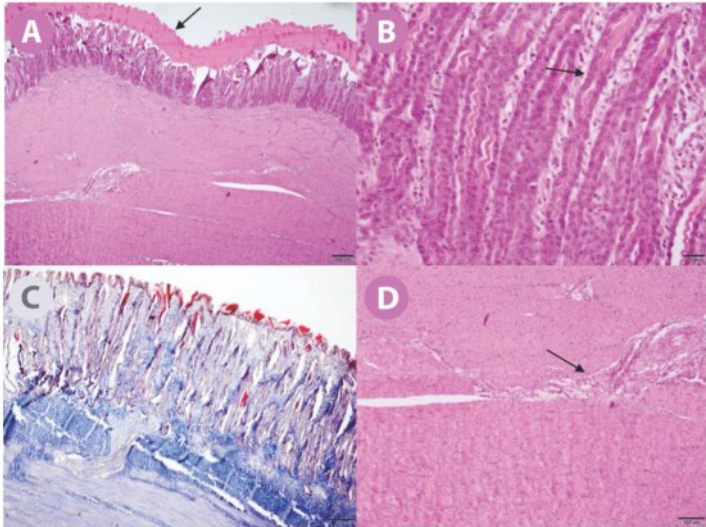


Imagen suministrada por la autoría

**Figura 4.-** Estómago muscular o molleja. **A.** Se observa la túnica mucosa con las glándulas encargadas de la secreción de la koilina y que a su vez forman también parte de la cutícula (flecha). **B.** Se ven las láminas verticales de koilina entre las células (flecha). **C.** Tinción de TCM. Epitelio y glándulas de la mucosa. **D.** Túnica muscular bien desarrollada con vasos entre las capas (flecha).

## Intestino

El intestino de las aves es más corto que el de los mamíferos aunque su longitud está relacionada con el tipo de alimentación, siendo más largo en las granívoras como las gallinas. Las vellosidades intestinales se encuentran tanto en el intestino delgado como en el grueso y su altura va disminuyendo desde el duodeno hacia la porción más caudal. No presentan vasos quilíferos en el centro y las criptas de Lieberkuhn se encuentran en la parte inferior de las vellosidades. En cuanto a las células, los enterocitos van disminuyendo a medida que avanzamos en el tubo digestivo y aumentando las células caliciformes.

### Intestino delgado

Las vellosidades en este tramo son más largas y las criptas más profundas que en el intestino grueso. Van disminuyendo de longitud desde el duodeno hasta el íleon donde son más bajas (ver Figura 5).

En numerosos estudios de nutrición, para evaluar modificaciones en la histología intestinal con diferentes dietas, se realizan

estudios histomorfométricos evaluando longitud y anchura de vellosidades, profundidad de las criptas, relación entre altura de vellosidades y profundidad de las criptas o el número de células caliciformes por campo de 40 aumentos (esto último, preferentemente mediante las técnicas de ácido periódico de Schiff-PAS)<sup>7</sup>. Estos valores permiten realizar una estimación del área disponible en la mucosa intestinal para la digestión y la absorción<sup>7,8</sup> (ver Figura 5A).

En el epitelio de la mucosa se encuentran distintos tipos de células como enterocitos, células caliciformes, células entero-endocrinas y en la base de las criptas, las basales, que son células madre (ver Figuras 5B, 5D y 5F).

Los enterocitos son células cilíndricas que se van tornando cúbicas a media que descendemos en la vellosidad y que son las células encargadas de la absorción. En la parte más apical, presentan un ribete en cepillo con microvellosidades para aumentar la superficie de absorción (ver Figura 5B). Entre ellos se intercalan las células caliciformes similares a las de los mamíferos y productoras de mucina, una glicoproteína que protege y lubrica la pared intestinal. Por último, están las células entero-endocrinas, que son más numerosas en las criptas y que secretan hormonas<sup>9</sup>. El intestino de las aves carece de células de Paneth.

La lámina propia, constituida por tejido conjuntivo, forma la parte central de las vellosidades y también una pequeña capa bajo ellas, junto con fibras musculares de la muscular de la mucosa. En esta lámina propia podemos encontrar tejido linfóide asociado a la mucosa como las placas de Peyer, aunque es mucho más abundante en el intestino grueso.

La túnica submucosa es muy delgada y en ocasiones sólo se observa cuando aparecen los plexos nerviosos de Meissner. La túnica muscular es más gruesa y está formada por una capa circular interna y una longitudinal externa. Entre ambas se observan vasos y el plexo nervioso mientérico<sup>9</sup>, que en las aves también permite el reflujo hacia la molleja para aumentar la eficacia de la digestión. La túnica serosa es de nuevo tejido conjuntivo y un mesotelio.

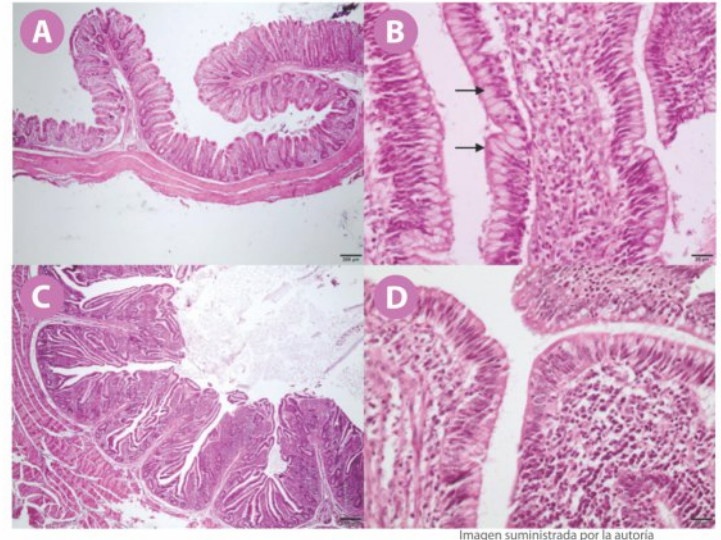


**Figura 5.-** Intestino delgado. **A.** Duodeno. **C.** Yeyuno. **E.** Íleon. La altura de las vellosidades va disminuyendo y aumentando las células caliciformes. Se observa el ribete en cepillo de los enterocitos en su parte apical. **B. D.** y **F.** Epitelio de la mucosa con enterocitos, células caliciformes, células entero-endocrinas y en la base de las criptas, las basales.

## Intestino grueso

El intestino grueso es corto en relación con el de los mamíferos, consta de 2 ciegos y un segmento colo-rectal<sup>5</sup>. En la entrada del ciego, las vellosidades forman una especie de red que separa el contenido que pasa al colon, siendo más cortas y anchas que en el intestino delgado (ver Figura 6).

El resto de las tunicas se mantienen igual; en la mucosa, la proporción de células caliciformes es mayor que en el intestino delgado (ver Figura 6B), y la lámina propia es más rica en formaciones linfoides (ver Figura 6D). La principal función del intestino grueso es la absorción de agua y electrolitos.



**Figura 6.-** **A.** y **B.** Ciego. **C.** y **D.** Colon. En ambos se mantienen las vellosidades, aumentando la presencia de células caliciformes (flechas), sobre todo en el ciego y las formaciones linfoides en el colon.

## Cloaca

El tubo digestivo termina en la cloaca que comparte con el aparato genital y urinario. Muestra tres partes, desde la parte más craneal a la más caudal se denominan: coprodeo y proctodeo.

El coprodeo es histológicamente muy similar al colon y está separado del resto de la cloaca por un pliegue de la mucosa. El proctodeo también se parece al resto del intestino grueso con vellosidades y criptas cortas; sin embargo, en el urodeo las vellosidades desaparecen, quedando los pliegues. En él se abren los uréteres, los conductos deferentes en machos y el oviducto izquierdo en las hembras, de ahí que las gallinas eliminen al mismo tiempo el contenido fecal y la orina.

## Hígado

Este órgano se encuentra en la parte central de la cavidad visceral y está formado por dos lóbulos<sup>5,6</sup>. Histológicamente está formado por lobulillos hepáticos no demasiado definidos, como en el caso de los mamíferos. Está constituido por una vena centrolobulillar desde la que se disponen, de forma radial, las trabéculas formadas por dos hepatocitos separadas por los sinusoides recubiertos por células endoteliales y las células de Kupffer que son los

# HISTOPATOLOGÍA

macrófagos sinusales. Entre los sinusoides y los hepatocitos está el espacio perisinusoidal, con presencia de las células de Ito o estrelladas que son las encargadas de almacenar la vitamina A y otras vitaminas liposolubles (ver Figura 7)

Entre las trabéculas de hepatocitos también se encuentran los canaliculos biliares intralobulillares, tapizados por pocas células epiteliales planas. Los hepatocitos vierten la bilis a esos canaliculos que se reúnen en los conductillos biliares, recubiertos de epitelio cúbico. Junto con la rama de la vena porta y de la arteria hepática, los canaliculos biliares forman los espacios porta (ver Figura 7C). En las gallinas, los conductillos biliares se unen en dos conductos biliares, uno desemboca directamente en el duodeno, y el otro en la vesícula biliar donde se almacena y concentra la bilis. Por otro lado, la sangre de la arteria hepática y la vena porta se mezclan en los sinusoides hepáticos y se vuelca hacia la vena centrolobulillar<sup>6</sup> (ver Figura 7D).

Los hepatocitos tienen una forma poligonal, con núcleo grande, normalmente en posición central y un citoplasma eosinófilo, muy rico en mitocondrias y retículo endoplásmico liso y rugoso.

El tejido conectivo interlobulillar es escaso. Externamente el hígado se recubre de tejido conjuntivo fibroso que forma parte del mesotelio y sobre el que aparece la túnica serosa.

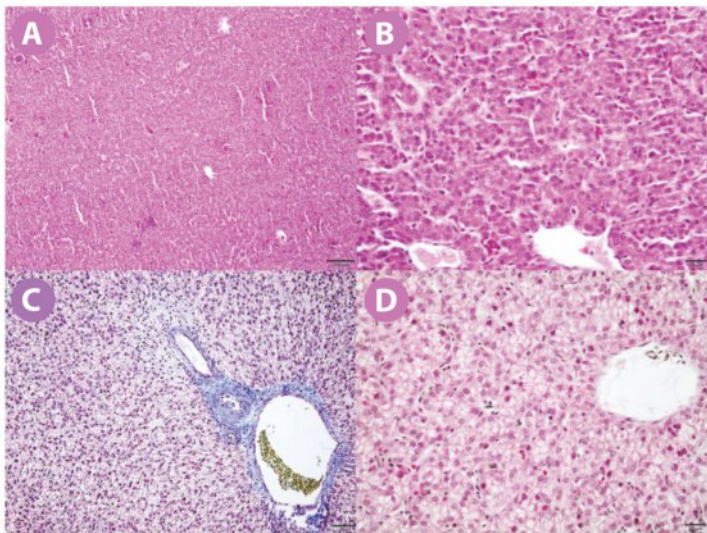


Imagen suministrada por la autora

**Figura 5.-** Hígado. **A.** y **B.** Hematoxilina-eosina. **C.** y **D.** Tinción TCM. **C.** Se observa un espacio porta con la arteria y vena portal y varios conductos biliares. **D.** Vena centrolobulillar.

## CONCLUSIONES

Cada año es mayor el número de aves que se utilizan en procedimientos científicos, donde el estudio del aparato digestivo es fundamental en muchos de ellos. Tratan de mejorar la salud digestiva de las aves como herramienta fundamental para la prevención de enfermedades y la mejora del bienestar animal en general, alcanzando unas producciones más sostenibles y menos dependientes del uso de sustancias exógenas. Por eso, es importante conocer la histología de dicho aparato y las posibilidades de realizar estudios histomorfométricos que se correlacionen con los distintos ensayos realizados.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Informe sobre usos de animales en experimentación y otros fines científicos incluyendo la docencia en 2020. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cinegéticas. Noviembre 2021.
2. <https://www.fao.org/poultry-production-products/production/nutrition-feeding/es/>
3. Adhikari P, Kiess A, Adhikari R, et al. *An approach to alternative strategies to control avian coccidiosis and necrotic enteritis.* Journal Applied Poultry Research. 2020;29(2):515-534.
4. Incharoen T, Yamauchi K, Erikawa T, et al. *Histology of intestinal villi and epithelial cells in chickens fed low-crude protein or low crude fat diets.* Italian Journal Animal Science. 2010;9 (e82):429-439.
5. Zanuzzi C y Barbeito C. *Sistema digestivo.* In González N y Barbeito C. *Histología de las aves.* Editorial Universidad Nacional de la Plata. Buenos Aires, Argentina. 115. 2014.
6. Digestive System. In Liebich H-G. *Veterinary Histology of Domestic Mammals and Birds.* Sheffield, UK. 5M Publishing. 179. 2019.
7. Amer SA, Beheiry RR, Fattah DMA, et al. *Effects of different feeding regimens with protease supplementation on growth, amino acid digestibility, economic efficiency, blood biochemical parameters, and intestinal histology in broiler chickens.* Veterinary Research. 2021;17:283-299.
8. Verdal H, Mignon-Grasteau S, Jeulin C, et al. *Digestive tract measurements and histological adaptation in broiler lines divergently selected for digestive efficiency.* Poultry Science. 2010;89:1955-1961.
9. Digestive tract. In Junqueira's *Basic Histology.* Text and Atlas. 15 ed. Mescher A. Mac Graw-Hill. NY (EEUU). 295. 2018.

## Diseño de una Sala de Nivel 2 de Contención Biológica (NCB2)

**Consuelo Escrivá**

*Responsable del Servicio de Bioseguridad del Instituto de Biología Integrativa de Sistemas (I2SysBio)*

**Palabras clave:** bioseguridad, NCB2, laboratorio.

### INTRODUCCIÓN, ANTECEDENTES Y CONCEPTO DE DISEÑO

El 4 de diciembre de 2020, se publicó en el BOE la nueva Orden TES/1180/2020 por la que se adaptó, en función del progreso técnico, el Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo, modificándose las indicaciones relativas a las medidas de contención y a los niveles de contención recogidas en el Anexo IV del citado Real Decreto. Esto afectó al diseño de una Sala de Contención Biológica, puesto que las medidas que hasta la fecha se consideraban como “Aconsejable” pasaron a ser de obligado cumplimiento excepto si, por la naturaleza de las actividades, los resultados de la evaluación del riesgo para los trabajadores, y las características del agente biológico de que se trate –a que se hace referencia en el artículo 4–, indiquen lo contrario.

En el Instituto de Biología Integrativa de Sistemas (I2SysBio), centro mixto de la Universidad de Valencia (UV) y del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), ubicado en el Parque Científico de la Universidad de Valencia, se ha puesto en funcionamiento una moderna Sala de Nivel 2 de Contención Biológica (NCB2) siguiendo la reciente Normativa, por lo que presentamos su desarrollo como muestra del diseño de un NCB2 según la Orden TES/1180/2020. Este Laboratorio ha sido creado fundamentalmente para desarrollar trabajos con bacterias pertenecientes o asimiladas al grupo de riesgo 2 (GR2) de patógenos humanos, y, especialmente, con bacterias de cuarentena que requieren un sistema de contención con presión negativa (ver Figura 1). El laboratorio ha sido cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional en el marco del Programa Operativo Plurirregional de España 2014-2020 y la Universidad de Valencia como titular y promotor.



Imagen suministrada por la autoría

**Figura 1.-** Vista panorámica del laboratorio de cabinas de la Sala NCB2 del I2SysBio.

Su puesta en funcionamiento ha supuesto un trabajo muy meticuloso de diseño, con un recorrido largo, desde que en diciembre de 2019 la Dirección del I2SysBio asumiera el compromiso de ampliar la dotación de infraestructuras, el cual ya contaba con otra sala de NCB2 fundamentalmente diseñada para la investigación con agentes patógenos virales pertenecientes o asimilados al GR2. Si bien, esta primera sala de NCB2 se había diseñado durante la construcción del I2SysBio, esta segunda sala de NCB2 no había sido programada, ya que no se contaba con trabajar asiduamente con bacterias patógenas.

El primer reto para su construcción fue encontrar en el I2SysBio el espacio adecuado –diferente al del laboratorio de virus– para trabajar con bacterias. Esta ubicación tenía que respetar la estructura de los laboratorios del centro y al mismo tiempo permitir una conexión fácil con todos los sistemas de electricidad, datos, suministro de agua, control ambiental, y seguridad del instituto. A tal efecto, se decidió utilizar el espacio destinado a una sala de reuniones y a un despacho contiguo. En total sumaban unos 40 m<sup>2</sup> situados en la primera planta del I2SysBio, justo enfrente de la sala de NCB2 ya existente (ver Figura 2). La

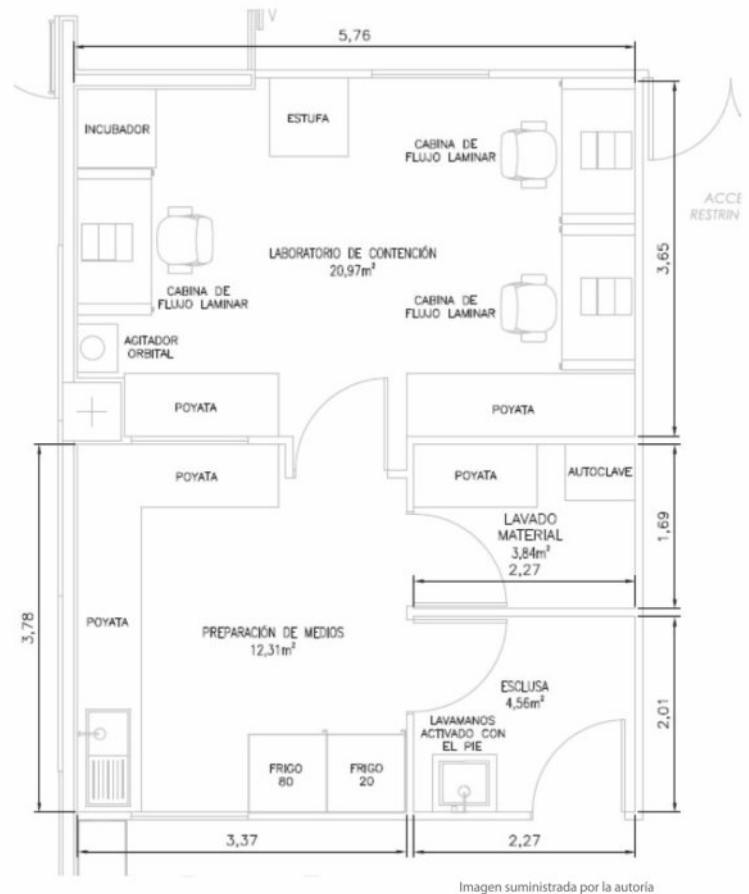
proximidad de ambas salas podría dar la opción de compartir algunos de los sistemas de canalización de la ventilación, pero finalmente se consideró inviable por diferentes motivos técnicos y de bioseguridad. La elección de los dos espacios contiguos nos permitía compartimentar la nueva sala de NCB2, y sin tener que realizar grandes transformaciones, se podrían diseñar dos laboratorios fácilmente comunicables manteniendo la luminosidad, y la comunicación con el exterior utilizando las puertas y ventanas existentes en ambos espacios. A partir de aquí, se diseñaron varias propuestas de compartimentación de la sala, una para dar cabida a una zona de esterilización y otra para la exclusiva de entrada a la sala. De esta manera la sala tendría 4 espacios bien diferenciados que, a su vez, podrían mantener presiones de aire también diferenciadas (ver Figura 3).



**Figura 2.-** Espacio destinado a la nueva sala de NCB2.

Este primer diseño sirvió para solicitar los fondos para la construcción y equipamiento de la sala a la Convocatoria de Infraestructuras del Plan Estatal de I+D+I. Una vez concedidos, este primer esquema se utilizó para comenzar los trámites del diseño formal del proyecto de obra y su adjudicación por concurso público. En el mes de mayo de 2020 y en plena pandemia de la COVID-19, se elaboró el primer anteproyecto de la sala por la empresa de ingeniería adjudicataria del concurso, el

cuál fue aprobado como proyecto definitivo a finales del citado año tras algunas revisiones. En este proyecto se consideró, finalmente, que todos los sistemas de funcionamiento de las dos salas NCB2 del I2SysBio fueran totalmente independientes.



**Figura 3.-** Diseño de la nueva sala de NCB2 con cuatro espacios diferenciados.

La construcción de la nueva sala comenzó en mayo de 2021 y finalizó en el último trimestre de ese mismo año. Recientemente, la sala acaba de recibir el informe favorable del Comité de Bioseguridad de la UV y se procederá a su legalización ante las autoridades competentes de la Generalitat Valenciana. En este sentido, es importante destacar las consideraciones científico-técnicas que se tuvieron en cuenta para: el diseño, la ubicación de los espacios, los equipos y las bancadas de trabajo de la sala; así como todos los requisitos y medidas de contención de conformidad con el Anexo IV del RD 664/1997 y la Orden Ministerial que lo modifica (TES/1180/2020), que se muestran a continuación para las instalaciones de NCB2.

Las medidas que figuran en el presente anexo (ver Tabla 1) se aplicarán según la naturaleza de las actividades, la evaluación del riesgo para los trabajadores y las características del agente biológico. El término "Aconsejable", en principio, significa que las

medidas deben aplicarse, excepto si los resultados de la evaluación a que se hace referencia en el artículo 4 indiquen lo contrario.

Tabla 1.-Medidas de contención del Anexo IV del RD 664/1997.

A. Medidas de contención	B. Niveles de contención		
	2	3	4
<b>Lugar de trabajo</b>			
1. El lugar de trabajo se encontrará separado de toda actividad que se desarrolle en el mismo edificio	No	Aconsejable	Sí
2. El lugar de trabajo deberá poder precintarse para permitir su desinfección	No	Aconsejable	Sí
<b>Instalaciones</b>			
3. El material infectado, animales incluidos, deberá manejarse en una cabina de seguridad biológica o en un aislador u otra contención apropiada	Cuando proceda	Sí, cuando la infección se propague por el aire	Sí
<b>Equipos</b>			
4. El aire introducido y extraído del lugar de trabajo se filtrará mediante la utilización de filtros absolutos HEPA <sup>(1)</sup> o similares	No	Sí, para la salida de aire	Sí, para la entrada y la salida de aire
5. El lugar de trabajo se mantendrá con una presión negativa respecto a la presión atmosférica	No	Aconsejable	Sí
6. Superficies impermeables al agua y de fácil limpieza	Sí, para el banco de pruebas o mesa de trabajo y el suelo	Sí, para el banco de pruebas o mesa de trabajo, el suelo y otras superficies determinadas mediante una evaluación de riesgo	Sí, para el banco de pruebas o mesa de trabajo, las paredes, el suelo y los techos
7. Superficies resistentes a ácidos, álcalis, disolventes, desinfectantes	Aconsejable	Sí	Sí
<b>Normas de trabajo</b>			
8. Solamente se permitirá el acceso al personal designado	Aconsejable	Sí	Sí, mediante esclusa <sup>(2)</sup>
9. Control eficaz de los vectores (por ejemplo, roedores e insectos)	Aconsejable	Sí	Sí
10. Procedimientos de desinfección especificados	Sí	Sí	Sí
11. Almacenamiento de seguridad para agentes biológicos	Sí	Sí	Sí, almacenamiento seguro
12. El personal deberá ducharse antes de abandonar la zona de contención	No	Aconsejable	Aconsejable
<b>Residuos</b>			
13. Proceso de inactivación validado para la eliminación segura de las canales de animales	Aconsejable	Sí, dentro o fuera de las instalaciones	Sí, en las instalaciones
<b>Otras medidas</b>			
14. Laboratorio con equipo propio	No	Aconsejable	Sí
15. Se instalará una ventanilla de observación, o un dispositivo alternativo, que permita ver a sus ocupantes	Aconsejable	Aconsejable	Sí

## MEDIDAS DE CONTENCIÓN DE CARACTER CONSTRUCTIVO Y REVESTIMIENTOS

### Medida nº1. El lugar de trabajo se encontrará separado de toda actividad que se desarrolle en el mismo edificio

El lugar de trabajo se encuentra separado de toda actividad que se desarrolla en el edificio.

Para ello, se dismantelaron las instalaciones de la zona afectada: iluminación, tomas y cableados eléctricos, detección contra incendios, conductos, difusores, rejillas y equipos a desplazar; dejando las esperas y derivaciones necesarias para mantener las instalaciones en funcionamiento que daban servicio a los locales adyacentes, procediéndose, posteriormente, a instalar detectores ópticos de humos en el nuevo laboratorio de NCB2. También se debió de instalar un extintor de CO<sub>2</sub> para la extinción de fuegos tipo B en la zona del nuevo cuadro eléctrico. En la construcción se siguió la Norma UNE-EN 12128 para los Niveles de Contención de los laboratorios de microbiología, zonas de riesgo, instalaciones y requisitos físicos de seguridad.

Como se puede apreciar en la Figura 3, el Laboratorio consta de 4 espacios diferenciados:

1. Una esclusa desde la que se accede, en la que se disponen los equipos de protección individual (EPIs) necesarios para la entrada, así como un pequeño armario resistente a desinfectantes donde se guarda el material de limpieza. En este compartimento se localiza una pileta con grifo accionado por pedal para el lavado de manos antes de abandonar el laboratorio.
2. Una primera sala llamada "Laboratorio preparación de medios".
3. Una pequeña sala anexa donde se localiza el autoclave, para la esterilización de los residuos biológicos y material.
4. Una segunda sala llamada "Laboratorio de contención" donde se localizan las cabinas de seguridad biológica.

### Medida nº2. El lugar de trabajo deberá poder precintarse para permitir su desinfección

La instalación puede precintarse para permitir su desinfección, dadas sus características estructurales (ver Figura 3).

Solo cuenta con una puerta de acceso y con salida de aire filtrado, directo al exterior y fácilmente precintable.

### Medida nº4. El aire introducido y extraído del lugar de trabajo se filtrará mediante la utilización de filtros HEPA absolutos o similares

La instalación cuenta con filtración HEPA H-14 tanto para la entrada como para la salida del aire al laboratorio.

La construcción del sistema de ventilación es totalmente independiente del resto del edificio, evitándose la recirculación del aire, con salida directamente al exterior. Este no es un requisito para laboratorios NCB2 pero aumenta la calidad del aire, reduciendo la posibilidad de contaminaciones en los cultivos y la seguridad del laboratorio.

### Medida nº5. El lugar de trabajo se mantendrá con una presión negativa respecto a la presión atmosférica

Aunque este tampoco es un requisito propio de los laboratorios de NSB2, uno de los aspectos técnicos más importantes de esta instalación es que cuenta con un sistema que permite mantener diferentes presiones negativas de aire en cada zona. La presión negativa aporta un elemento de seguridad adicional que se necesita para trabajar con organismos de cuarentena como puede ser el caso de la *Xylella fastidiosa*.

Considerando que el exterior de la sala está a una presión de 0 Pascales (Pa), las presiones de los compartimentos en el interior son:

1. Esclusa: -5 Pa (respecto al exterior).
2. Laboratorio preparación medios: -10 Pa (respecto a la esclusa) y -15 Pa (respecto al exterior).
3. Laboratorio de contención: -10 Pa (respecto a la esclusa) y -15 Pa (respecto al exterior).
4. Zona de autoclave: -10 Pa (respecto a los laboratorios) y -25 Pa (respecto al exterior).

Para poder verificar estos valores, existen sondas de presión en el laboratorio, las cuales están conectadas a un sistema electrónico monitorizado, que diariamente es controlado por el personal de mantenimiento del I2SysBio.

## Medidas nº6 y nº7. Superficies impermeables al agua y de fácil limpieza, y superficies resistentes a ácidos, álcalis, disolventes y desinfectantes

Los suelos y las paredes de la sala de NCB2 son impermeables al agua, gracias a su recubrimiento de PVC especial, siendo a su vez resistente a ácidos, álcalis, disolventes y desinfectantes. Esta norma también se aplica a todo el mobiliario. Las uniones entre paredes y suelos son redondeadas en escocia (ver Figura 4), lo que facilita la limpieza manual. En cuanto a las conexiones de electricidad y datos en las paredes, así como las luminarias y las rejillas del techo, están selladas para mantener la estanqueidad y la continuidad de las superficies.



Imagen suministrada por la autoría

Figura 4.- Vista del mobiliario, paredes y suelos (vista de las escocias).

## Medida nº15. Se instalará una ventanilla de observación, o un dispositivo alternativo, que permita ver a sus ocupantes

El laboratorio es visible desde el exterior a través de una panorámica de visualización (ver Figura 5). Se practicó una ventana en el lugar que ocupaba la anterior puerta de acceso a la sala de reuniones, de manera que se puede observar perfectamente al personal que está trabajando en el interior de la sala desde el pasillo, lo que permite dar la alarma desde el exterior en caso de observar un accidente o incidente.



Imagen suministrada por la autoría

Figura 5.- Ventana que permite la visión de la sala de NCB2 desde el exterior.

## MEDIDAS DE CONTENCIÓN DEL CONTROL DE ACCESO, REDES DE SERVICIO Y SISTEMAS DE ALARMA

### Medida nº8. Solamente se permitirá el acceso al personal designado

Como se puede apreciar en la Figura 3, el acceso a la sala se efectúa a través de una esclusa (recinto con doble puerta), estando ambas puertas enclavadas entre sí, proporcionando la máxima restricción de acceso. Se puede observar que la puerta de entrada y la siguiente puerta, disponen de un "ojo de buey" que proporciona visibilidad ante la presencia de algún usuario en su interior.

Es de destacar que se dispone de acceso restringido controlado mediante tarjeta electrónica (ver Figura 6), lo que permite disponer de un histórico de accesos. El permiso de acceso a la sala está codificado en esta tarjeta de manera independiente al de otros permisos también codificados en ella, que dan acceso a otras instalaciones del I2SysBio. De esta forma no hay que portar una tarjeta distinta para cada acceso. Como control adicional en la entrada se expone la relación de los agentes patógenos con los que se está trabajando en los diversos proyectos de investigación en ese momento en la sala.

La sala cuenta con sistemas de conexión de datos y telefonía. Se han incluido además como elementos de seguridad como un sensor del nivel de O<sub>2</sub> y otro de CO<sub>2</sub> ambiental (ver Figura 4), contando con un sistema de alarma interior (acústica y lumínica) conectada al sistema general del edificio para la detección y prevención de incendios.



Imagen suministrada por la autoría

**Figura 6.-** Puerta de acceso con control electrónico diferenciado.

### **Medida nº9. Control eficaz de los vectores (por ejemplo, roedores e insectos)**

Este control se realiza mediante trampas que colocan y revisan periódicamente una empresa cualificada dependiente de la Universidad de Valencia.

### **MEDIDAS DE CONTENCIÓN DE MOBILIARIO E INSTRUMENTACIÓN**

#### **Medidas nº11 y nº14. Almacenamiento de seguridad para agentes biológicos y laboratorio con equipo propio**

En el Laboratorio de preparación de medios se dispone, entre otros instrumentos (como una centrífuga refrigerada de mesa, vórtex, pequeñas estufas...), de los equipos de frío combis y el ultracongelador de -80°C con cerradura de seguridad (ver Figura 4) para el almacenamiento del inventario de los agentes biológicos y de los reactivos. Esta sala dispone también de una pequeña piletta para limpieza del material, contando con dos grifos: uno de agua corriente y otro de agua desionizada.

Desde esta primera sala se tiene acceso al compartimento donde se ubica un autoclave de vacío, necesario para la inactivación de los residuos biológicos, la esterilización del material y los medios de cultivo, dónde se lleva a cabo un registro y validación regular de los ciclos de esterilización (ver Figura 7), cumpliendo así, también, con la medida nº10.



Imagen suministrada por la autoría

**Figura 7.-** Cámara del autoclave.

#### **Medida nº10. Procedimientos de desinfección especificados**

La inactivación de los residuos y agentes biológicos se realiza mediante autoclavado, pero también se inactivan los efluentes y residuos líquidos contaminados que se generan en las cabinas de seguridad biológicas mediante los llamados *Vacusafe* (sistema que contiene una bomba de vacío para aspirar los líquidos de forma limpia, ya que su interior se rellena con hipoclorito de sodio diluido).

#### **Medida nº3. El material infectado, animales incluidos, deberá manejarse en una cabina de seguridad biológica o en un aislador u otra contención adecuada**

A continuación, se encuentra el Laboratorio de contención (ver Figura 3) que dispone de cabinas de seguridad biológica nivel 2 (CSB2), las cuales son validadas periódicamente, al tiempo que está programada su revisión anual por una empresa técnica cualificada. En esta sala se disponen la mayor parte de equipos científicos necesarios como incubadores de CO<sub>2</sub>, agitadores

orbitales con temperatura controlada, estufas de cultivo, centrífuga de alta velocidad, microscopio de óptica invertida, pequeño espectrofotómetro, así como todo el pequeño equipamiento necesario para el desarrollo de los protocolos experimentales. En cuanto al mobiliario, la elección se ha basado en el cumplimiento de los requisitos de ser: liso, lavable, impermeable al agua y resistente a los descontaminantes y a químicos en general (ver Figura 4 y Medidas nº6 y nº7).

## BIBLIOGRAFÍA

- Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 6th Edition. CDC. <https://www.cdc.gov/labs/BMBL.html>
- Guía Técnica para la prevención y evaluación de los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. [https://www.insst.es/documents/94886/96076/agen\\_bio.pdf/f2f4067d-d489-4186-b5cd-994abd1505d9](https://www.insst.es/documents/94886/96076/agen_bio.pdf/f2f4067d-d489-4186-b5cd-994abd1505d9).
- Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. Organización Mundial de la Salud. 4ª edición, 2020. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240011311>
- Orden Ministerial (TES/1180/2020), de 4 de diciembre, por la que se adapta en función del progreso técnico el Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo. <https://www.boe.es/eli/es/o/2020/12/04/tes1180>
- Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo. <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-1997-11144>.
- UNE-EN 12128:1998 Biotecnología. Laboratorios de investigación, desarrollo y análisis. Niveles de contención de los laboratorios de microbiología, zonas de riesgo, instalaciones y requisitos físicos de seguridad.



## LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL DA

# VIDA

**SECAL** sociedad española  
para las ciencias  
del animal de laboratorio

## Entrevista a Conchi Timón Esteban Técnico de Animalario en el CNIO



**¿Desde cuándo eres socia de la SECAL y que te motivó para unirme a nuestra sociedad?**

Soy socia de la SECAL desde el 2013. Llevo trabajando en un animalario desde el 2006 y pensé que era una buena manera de estar más informada.

**Para conocerte un poco más, cuéntanos tu experiencia dentro del mundo de la Ciencia del Animal Laboratorio.**

Conocí este trabajo a través de una compañera del Ciclo Superior de Anatomía Patológica. Yo no conocía nada de los animalarios y ella trabajaba como Técnico de Animalario y le apasionaba su trabajo, así que cuando terminé mis estudios, empecé a trabajar como cuidadora. Me gustaba tanto el trabajo que al poco tiempo tuve la oportunidad de ascender a Técnico de Animalario.

**Cuéntanos un poco tu trabajo dentro del animalario.**

Uno de mis cometidos dentro del animalario es gestionar las colonias de roedores de diferentes grupos de investigación de mi centro. Aunque esto conlleva bastante trabajo, también presto soporte a la realización de diferentes procedimientos, como por ejemplo, tratamientos oncológicos. Además, realizo el seguimiento de todos los animales que tengo a mi cargo aportando enriquecimiento si es necesario, controlando las dietas especiales... En definitiva, controlando el bienestar de los animales.

**Sabemos que el trabajo en los animalarios muchos días es frenético, pero, ¿tienes tiempo para dedicarte a otras actividades como la investigación o la formación? Si es así, cuéntanos un poco lo que haces.**

Solemos tener cursos de formación continuada, los cuales considero muy importantes ya que es necesario estar al día en este trabajo ¡La ciencia está en continuo cambio!

***Es necesario estar al día en este trabajo  
¡La ciencia está en continuo cambio!***

**Cuéntanos algún proyecto en el que te gustaría participar o hacer.**

Ahora mismo no tengo ningún proyecto en mente, pero siempre son bienvenidos los nuevos proyectos.

**Cuéntanos un poco tu experiencia con los investigadores.**

Tengo un trato directo con todos los investigadores, desde el que acaba de empezar la tesis como con el jefe de grupo. Les ayudamos a formarse en algunas técnicas y colaboramos con ellos en sus investigaciones a través de la gestión de sus colonias o con sus experimentos.

## ¿Qué es lo que más te gusta de tu trabajo?

Yo me organizo el trabajo cada día. Tengo momentos en los que trabajo en equipo y otros en los que trabajo sola. Me gustan los retos y cada día es diferente. Sabes cómo empieza el día, pero no como va a terminar porque siempre surgen cosas nuevas a lo largo de la jornada.

*Me gustan los retos y cada día es diferente.*

## Ha sido un año difícil con la pandemia. ¿Nos puedes contar brevemente como lo habéis vivido y como lo afrontasteis en el animalario?

Durante el confinamiento es cuando vivimos los momentos más duros, ya que no sabíamos muy bien lo que iba a pasar. Las cosas cambiaban constantemente y todo el mundo tenía que estar en sus casas, pero nosotros teníamos que salir porque había que cuidar de los animales ya que ellos solo nos tienen a nosotros. Los investigadores no podían venir y todo dependía de nosotros. Se hizo un plan de contingencia con diferentes niveles según la gravedad de la situación en ese momento y todos trabajamos en equipo, eso sí, separados en grupos burbuja.

## Crees que, con lo vivido durante la pandemia, la creación de vacunas, tratamientos... ¿se va a dar más importancia al animal de laboratorio tanto desde la sociedad como desde la administración?

Me gustaría pensar que la sociedad y la administración se han concienciado de lo importante que es la investigación, pero creo que no. Seguramente, esto pasara como pasa todo, así que habrá que aprovechar el momento para darle un empujón a la investigación y hacer que inviertan más dinero.

## Para terminar, si pudieras mandar un mensaje a nuestros dirigentes, ¿qué les dirías?

Es necesario que se invierta más dinero en investigación. Creo que es fundamental.

*Es necesario que se invierta más dinero en investigación. Creo que es fundamental.*



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](http://www.vivotecnia-ms.com)

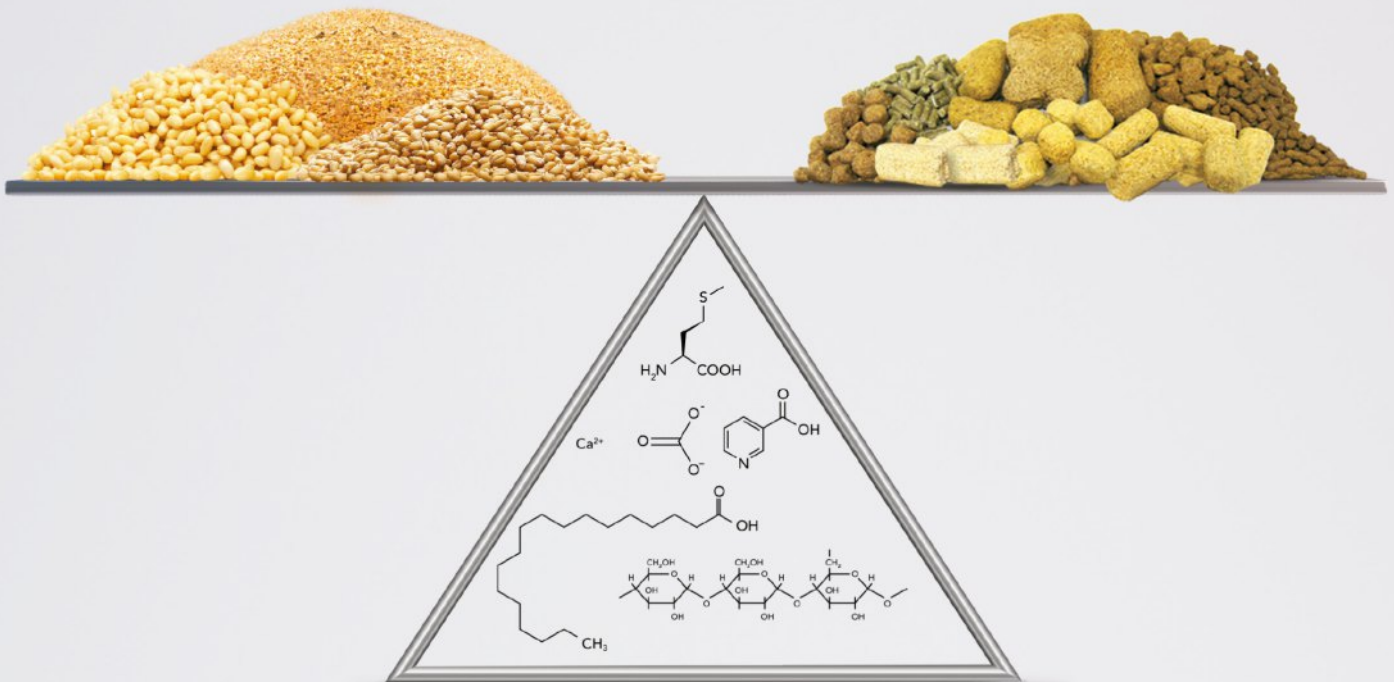


# The Weight is Over.

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](mailto: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](mailto:askanutritionist@envigo.com)

+

+

+