ANIMALES DE LABORATORIO

VERANO 2022 / NÚMERO 94

sociedad española
para las ciencias
del animal de laboratorio

Utilización de marcadores permanentes para la identificación de ratones.

Limitaciones actuales para investigación biomédica con primates no humanos en el escenario europeo.

Entrevista a Jordi Guinea Mejías.

ENVIGO

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

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

Download our radiosensitivity of immunodeficient mice white paper at:

envigo.com/r2g2-cancer

GRUPO EDITOR

REVISTA DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA PARA LAS CIENCIAS DEL ANIMAL DE LABORATORIO
www.secal.es
DIRECTORA
Lara Sedó Cabezón
direccion.revista@secal.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.cnic.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

EDITORIAL

Seguimos creciendo

En apenas dos meses desde la última publicación, volvemos con un nuevo ejemplar para este verano lleno de artículos interesantes y curiosos con los que ponernos al día, recoger ideas y aprender un poquito más.

Nos acompañan en este número Noticias y Actualidad en el que, por ejemplo, hablamos del pasado Día Internacional del Animal de Laboratorio; en Técnicas conoceremos más acerca del procedimiento de microinyección de embriones a lo largo del paso del tiempo; Transparencia y divulgación se estrena presentando la web de investigación y comunicación del uso de animales de la Universidad Complutense de Madrid; de la mano de Panorama conoceremos uno de los temas más controvertidos en la actualidad: las limitaciones en la importación de primates no humanos para su uso en investigación en Europa. Gracias a Reproducción y Genética aprenderemos sobre vectores adenoasociados; Seguridad en 5 minutos nos explicará y actualizará conocimientos sobre los tipos de extintores que te puedes encontrar en tu centro de trabajo, cómo y cuándo usar cada uno; Bienestar animal nos trae una nueva encuesta recientemente publicada acerca del uso de diferentes especies animales utilizadas como modelos en investigación; Indicios regresa con un interesante artículo sobre la utilización de marcadores permanentes para la identificación de roedores y despediremos el número con una enriquecedora entrevista a Jordi Guinea, quien se ha jubilado recientemente.

No os entretenemos más, llegan semanas en las que tenemos que llevar a cabo, más que nunca, la Cultura del Cuidado, así que cuídense y cuiden mucho.

¡Feliz verano!

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)

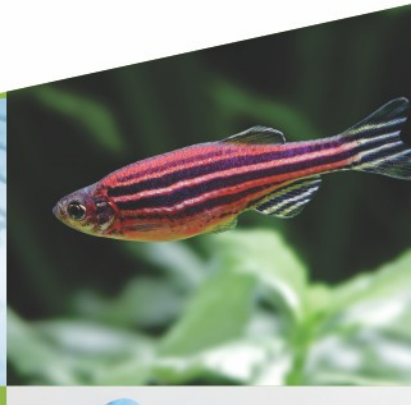
VICETESORERÍA
Gema Luque Diez (2021-2025)

VOCALÍAS (2021-2025)
IDEXX representado por David Mayo López
Yolanda Miralles López

SOCIOS BENEFACTORES

sociedad española para las ciencias del animal de laboratorio

- 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

www.secal.es

Directora
LARA SEDÓ CABEZÓN
direccion.revista@secal.es

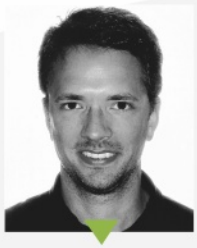
Subdirectora
MARÍA GRANADA PICAZO MARTÍNEZ
direccion.revista@secal.es

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

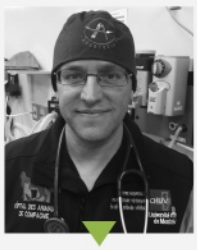
Al cuidado
JULIA SÁNCHEZ GARCÍA
julia.g.sanchez@gsk.com

¿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
JOSEP Mª MARIMON ESCUDÉ
jmmarimon@ub.edu

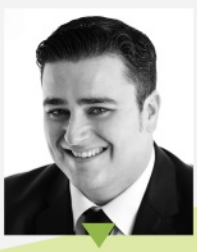
Reproducción y genética
MARTA CASADO PINNA
mcasado@ibv.csic.es



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

Métodos alternativos
GUILLERMO REPETTO KUHN
grepkuh@upo.es

Bienestar animal
GARIKOITZ AZKONA MENDOZA
gazkona@gmail.com

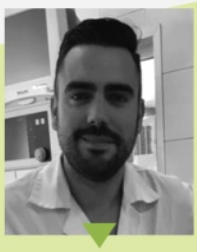


CEEA-OH
ALBERTO PASTOR CAMPOS
albertopastor@umh.es

Histopatología
ANA ISABEL NIETO RUIZ 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@quironsalud.es

Han colaborado en este número:

Carme Cucarella, Servicio de transgénesis y biotecnología del IBV-CSIC;
Patricia García García (Estabulario ULL y Universidad de la Laguna), 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

ÍNDICE

ANIMALES DE LABORATORIO
VERANO 2022 / NÚMERO 94

3 EDITORIAL

9 NOTICIAS

- Centros colaboradores de la SECAL.
- Un año sin recibir nuevos ratones corta las alas a los científicos canarios.
- "Genes de colores", nuevo libro de Lluís Montoliu.
- El desarrollo de nuevos métodos alternativos para reducir la experimentación animal, una de las prioridades temáticas de la Agencia Estatal de Investigación para la convocatoria de 2022.
- Seis nuevas instituciones se unen al Acuerdo COSCE por la transparencia en experimentación animal.

15 ACTUALIDAD

- Experimentación animal, ¿por qué sigue existiendo?
- La experimentación animal en Biomedicina.
- Recuperando conexiones.

19 TRANSPARENCIA Y DIVULGACIÓN

- Web de investigación con animales en la Universidad Complutense de Madrid (UCM): ejemplo de transparencia y comunicación del uso de los animales en investigación.

23 TÉCNICAS

- La microinyección de embriones y el paso del tiempo: desde la transgénesis aditiva a la edición genómica.

29 SEGURIDAD EN 5 MINUTOS

- El uso de extintores de polvo químico seco en Animalarios.

33 PANORAMA

- Limitaciones actuales para investigación biomédica con primates no humanos en el escenario europeo.

37 REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA

- Vectores AAV: pequeños virus, grandes posibilidades.

43 BIENESTAR ANIMAL

- Una encuesta sobre el uso de ratones, cerdos, perros y monos como modelos animales en la investigación biomédica.

53 INDICIOS

- Utilización de marcadores permanentes para la identificación de ratones.

57 ENTREVISTA

- Entrevista a Jordi Guinea Mejías, exjefe de la Unidad de Experimentación Animal de Biología de la Universitat de Barcelona.

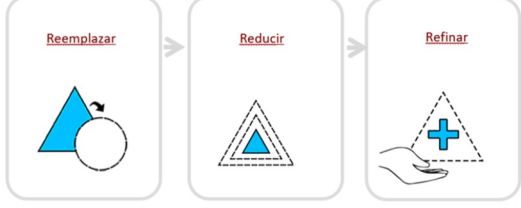


Imagen suministrada por la autoría

SAFE
COMPLETE CARE COMPETENCE

Complete Care Competence

Asegurando su Investigación

Su Colaborador para el Cuidado del Animal de Laboratorio

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

Quality. Reliability. SAFEty.

SAFE
COMPLETE CARE COMPETENCE

Diets
Custom Diets
Bedding
Enrichment
Services

DIETS | CUSTOM DIETS | BEDDING | ENRICHMENT

RETTENMAIER IBÉRICA S.L. Y CIA. S. COM. JRS Fibras diseñadas por la naturaleza

Teléfono 933 262 888
info@jrsiberica.com

www.safe-lab.com

Centros colaboradores de la SECAL

Palabras clave: institución, colaboración, socio.

La SECAL amplía las opciones de participación a través de una nueva fórmula con las empresas o instituciones.

Los puntos que definen esta nueva figura de centro colaborador son:

1. Se invitará a la empresa/institución a ser socio benefactor, pero no será obligatorio.
2. Se fija en **10 el número mínimo de socios** por ente colectivo.
3. La empresa a la firma del acuerdo debe especificar el nº concreto de trabajadores que se van a asociar.
4. Si hay cambios (alguna alta o baja de alguno) lo tiene que notificar en tiempo y forma para que podamos gestionarlo.
5. La empresa durante la duración del acuerdo es la que paga a la SECAL la factura completa.
6. Se aplicará un **descuento del 25% en la factura del primer año** (únicamente).
7. La duración mínima del **acuerdo será de dos años.**
8. Se le da la oportunidad a la empresa de insertar su **logo en la web** (no obligatorio).
9. No tiene ningún beneficio más como empresa, salvo los que tengan sus trabajadores por ser socios de la SECAL.
10. Cuando acabe el contrato, cada trabajador puede seguir siendo socio, pero lo abonará el mismo.

Para más información contactar con la secretaría de la SECAL: secretaria@secal.es

Un año sin recibir nuevos ratones corta las alas a los científicos canarios

Palabras clave: aerolíneas, investigación, animales de laboratorio.

A primeros de abril, el diario **El Día**, publicaba un artículo de denuncia con el titular: "**Un año sin recibir nuevos ratones corta las alas a los científicos canarios**", las aerolíneas han vuelto a bloquear el transporte hacia las islas.

Ya en 2016, Iberia y Air Europa con la excusa de que los animales podían poner en riesgo los cables de los aviones, vetaron su transporte. La situación llegó a ser tan ridícula que el Ejército y el Congreso de los Diputados tuvieron que intervenir enviando los animales retenidos con un avión militar. Finalmente, Iberia cedió a las peticiones del Gobierno de Canarias y los centros de investigación volvieron a recibir y enviar animales, pero ya nunca con normalidad.

Se calcula que hay 35 proyectos bloqueados por esta situación absurda. Uno de ellos es el de la investigadora Teresa Giráldez de la Universidad de la Laguna (ULL). Esta científica trabaja en la búsqueda de una cura del Síndrome de la X frágil, y una colaboración con la Universidad de Standford no se ha podido materializar por no poder enviar sus ratones.

Canarias es la única Comunidad Autónoma de España que sufre este tipo de dificultades para investigar de forma tan directa. Los animales no se pueden trasladar en barco ya que afectaría a su bienestar. Pero es un problema global que tiene desquiciados a los científicos de Europa y EE. UU.

Tras la publicación de esta noticia, Iberia se comprometió con el Gobierno de Canarias en retomar la actividad suspendida tras la pandemia, pero las buenas noticias han durado poco tiempo; Iberia, aludiendo a un cambio en la dirección general de la compañía en el Reino Unido, ha vuelto a bloquear los transportes. Tras estas nuevas excusas, se puede deducir que otros elementos de presión están llevando a la compañía a este comportamiento irracional.

Para Kirk Leech, director de la Asociación Europea para la Investigación Animal (EARA), es un problema de presión pública. La mayoría de las aerolíneas han dejado de transportar animales para su uso en investigación, *"ya sea por temor a un boicot general de su servicio por parte del público o campañas activistas insidiosas, creo que el temor es exagerado, dada la mejor comprensión pública de la investigación con animales, incluidos los ratones, que se utilizaron para producir vacunas contra la COVID-19"*, asegura Leech. El apoyo a estos experimentos creció hasta el 64% entre los estadounidenses en ese contexto: *"con el tema de Canarias, esto parece ser una decisión interna de la compañía, no ligada a una campaña pública; la aerolínea necesita comprender el daño que esto está causando a la investigación y, en última instancia, a la salud pública"*, defiende.

Para Javier Guillén, director en Europa y Latinoamérica de la Asociación para La Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio (AAALAC), *"estamos ante el absurdo de que el dinero público que se invierte en Canarias se pueda perder porque no se defiende que se pueda gastar bien"*, Giráldez coincide con él: *"si el Gobierno apoya la investigación, como es el caso, tiene que haber un apoyo institucional por encima de cualquier decisión privada arbitraria, la investigación debería estar priorizada. Sin estos medios, va a quebrar la capacidad de desarrollar ciencia"*, en respuesta a las preguntas de Javier Salas de la revista Materia que publicó también otro extenso artículo.

Al cierre de esta edición, todavía no se ha resuelto la situación, y el trato desigual a los científicos canarios continúa por esta situación absurda. Los aviones han vuelto a despegar gracias a las vacunas desarrolladas por científicos y sus investigaciones indispensables en animales. En cambio, las aerolíneas siguen penalizando a esos

- https://elpais.com/ciencia/2022-04-27/las-aerolineas-bloquean-el-transporte-de-animales-de-laboratorio-en-todo-el-mundo.html
- https://www.eldia.es/sociedad/2022/04/21/iberia-retracta-compromiso-trasladar-ratones-65237523.html
- https://www.eldia.es/sociedad/2022/04/03/ano-recibir-nuevos-ratones-corta-alas-64588830.html

"Genes de colores", nuevo libro de Lluís Montoliu

Palabras clave: divulgación, genética, libro.

El investigador del CSIC en el Centro Nacional de Biotecnología, **Lluís Montoliu**, presenta un nuevo libro publicado por la editorial Next Door Publishers. Se titula «**Genes de colores**» y es un libro de divulgación científica, en el que explica con sencillez numerosos temas relacionados con la genética de la pigmentación en los seres humanos y otros animales. En el libro se explica, por ejemplo, cómo llegamos a tener el color de pelo, de piel o de ojos que tenemos según las variantes génicas que heredemos de nuestros padres y madres. Al libro le da el toque de color, las ilustraciones sugerentes de **Jesús Romero**.

El libro está dividido en doce capítulos y cuenta además, con un epílogo, un glosario de términos y la lista de todos los genes relacionados con la pigmentación que se mencionan a lo largo del

libro. Este es un libro dedicado a un grupo de genes de nuestro genoma y el de otros animales, cuya función habitualmente es prescindible, pero cuyos efectos o alteraciones genéticas suelen ser escandalosamente visibles: son los genes de colores.

Imagen suministrada por la autoría

Figura 1.- Portada del libro Genes de colores.

El autor trata sobre la fascinación de las personas pelirrojas; de las que carecen de pigmentación por albinismo; de las que presentan manchas sin pigmentación (vitíligo) o con pigmentación; de por qué las personas negras son negras (y por qué no todos somos negros); de cómo podemos explicar genéticamente la gran variedad de colores que vemos en la piel, el pelo y los ojos; de los curiosos **patrones de colores que podemos ver en los gatos, los perros, los caballos, las cebras, los ratones, los camaleones y los pulpos**; y, finalmente, si podemos (o debemos) escoger el color de piel, pelo y ojos de nuestros hijos, y las consecuencias que podrían derivarse de ello. También incluye numerosas anécdotas históricas, como la de la **señora Abbie Lathrop**, criadora de ratones. Con su trabajo, sistematicidad y perseverancia, consiguió cepas de ratón con características específicas, genéticamente estables al convertirlas en consanguíneas. A ella acudían numerosos investigadores, por la calidad de sus animales.

El libro está a la venta en librerías desde el pasado 6 de abril de 2022.

El desarrollo de nuevos métodos alternativos para reducir la experimentación animal, una de las prioridades temáticas de la Agencia Estatal de Investigación para la convocatoria de 2022

Palabras clave: proyectos, reducción, REMA.

La Agencia Estatal de Investigación ha anunciado las 18 prioridades temáticas que se incluirán en la convocatoria de proyectos en líneas estratégicas 2022. Entre ellas, y por primera vez, se incluye el **desarrollo de nuevos métodos alternativos para reducir la experimentación animal.**

Ya hace años que tanto desde nuestro ámbito, como desde la Red Española para el Desarrollo de Métodos Alternativos a la Experimentación Animal (REMA) y otras asociaciones, se venía reclamando esta inyección de fondos públicos al desarrollo de alternativas contempladas también como uno de los objetivos en la Directiva 2010/63/UE.

AGENCIA ESTATAL DE INVESTIGACIÓN

- https://www.aei.gob.es/noticias/prioridades-tematicas-convocatoria-proyectos-lineas-estrategicas-2022

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 YEARS

Experience that improves lives

WWW.IWTSRL.IT | WWW.MATACHANA.COM

Seis nuevas instituciones se unen al Acuerdo COSCE por la transparencia en experimentación animal

Palabras clave: transparencia, investigación, animales de laboratorio.

Desde su lanzamiento en el año 2016, ya son 159 las instituciones que se comprometen a mejorar la transparencia hacia la sociedad con diferentes iniciativas, como informar públicamente de por qué y cómo investigan con animales a la sociedad y a los medios de comunicación. Desde la publicación del número 93 de la revista, seis nuevas instituciones se han unido al Acuerdo:

154 - Fundación Síndrome de Dravet.
155 - Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB).
156 - Asociación Española de Investigación sobre el Cáncer (ASEICA).
157 - Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL).
158 - Asociación Española de Bioseguridad (AEBioS).
159 - Federación Española de Epilepsia.

- Listado completo de las instituciones adheridas: https://cosce.org/entidades-adheridas/

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

Experimentación animal, ¿por qué sigue existiendo?

Palabras clave: modelos animales, mastocitos, divulgación.

El 24 de abril, Día Internacional del Animal de Laboratorio, la revista Muy Interesante ha dedicado un extenso artículo a la divulgación sobre la importancia de la experimentación con animales. La autora del artículo, **Sherezade MR**, doctora en Alergología en el Instituto de Alergología Fraunhofer asociado al Hospital Charité de Berlín, ha querido concienciar a la sociedad de lo importante que es su papel en la investigación. A lo largo del artículo, se explican los motivos por los que todavía no existen modelos artificiales que imiten a la perfección la complejidad de un organismo vivo. Como ejemplo más evidente actualmente del uso de modelos de ratón es el de probar la eficacia, tolerabilidad o dosis de nuevos tratamientos como es el caso de las vacunas.

Sherezade MR –especialista en el campo de la alergología– explica cómo también se utilizan los modelos de ratón para comprender funciones de células como los mastocitos, una de las principales implicadas en la respuesta inmunitaria. No se ha encontrado ninguna persona que no tenga mastocitos, y esto nos indica que deben ser imprescindibles. Sin embargo, cuando estas células son las causantes de una enfermedad, no está del todo claro qué les ocurre, como ocurre en las mastocitosis, donde estas células son "hipersensibles" y se activan ante cualquier estímulo, pudiendo causar anafilaxia y la muerte.

Para poder evaluar cómo funcionan los mastocitos se ha desarrollado un modelo de ratón llamado "Hello Kitty". Estos ratones presentan una modificación genética que elimina todos sus mastocitos, y aunque los ratones generados son viables, presentan algunas características o particularidades, como problemas intestinales o ser incapaces de combatir infecciones parasitarias.

"Disponer de estos modelos que no existen en humanos y son imposibles de replicar con células, nos ayuda a comprender la comunicación del sistema inmunitario y probar medicamentos para enfermedades como la mastocitosis" comenta la autora.

- https://www.muyinteresante.es/salud/articulo/experimentacion-animal-por-que-sigue-existiendo-661650580157

La experimentación animal en Biomedicina

Amanda Sierra, Ismael Mingarro, e Isabel Fabregat
Confederación de Sociedades Científicas de España (COSCE), Vocalía 3 – Ciencias de la Vida

Palabras clave: investigación, sociedad, debate.

Los médicos y los científicos saben que la investigación animal salva vidas. A pesar de ello, el **uso de animales en investigación** es un tema cada vez más controvertido en nuestra sociedad. A primera vista, puede parecer un debate polarizado entre dos posiciones antagónicas: los defensores de los derechos de los animales, frente a los que utilizan animales en su investigación. Sin embargo, este conflicto no es tal, ya que a **todos les guían los mismos principios éticos de bienestar animal.** Por ello, ante la creciente demanda de la sociedad de un mayor conocimiento de cómo y por qué se utilizan animales en experimentación, los

científicos deben dar un paso adelante y hacer más esfuerzo en explicar ambas cuestiones.

El cómo se utilizan animales en experimentación y en qué condiciones es un tema que concierne a todos, tanto animalistas como experimentadores en Biomedicina. Es un tema crítico, no solo por principios éticos sino incluso por la propia validez de los estudios científicos, ya que los animales en mal estado de salud o estresados dificultan la obtención de resultados sólidos y replicables. Tanto en España como a nivel internacional, la experimentación animal se guía por los principios de las 3Rs: reemplazar los estudios en animales con otros modelos alternativos; reducir el número de animales utilizados; y refinar los métodos utilizados de manera que se minimice el sufrimiento animal. Para asegurar que estos criterios se cumplen, todos los investigadores que utilizan animales en su investigación deben tener un entrenamiento teórico-práctico y obtener una acreditación específica. Además, cada uno de los procedimientos que se realizan en los animales sigue un proceso regulado estrictamente que tiene que ser evaluado previamente por un comité de ética experto, y aprobado por la autoridad competente a nivel autonómico, siguiendo directrices europeas.

Desde la Confederación de Sociedades Científicas de España (COSCE) hemos querido refrendar la importancia de la investigación animal ética[1], para lo que hemos emitido un comunicado que puede tomarse como una declaración de principios. COSCE alberga la Comisión de Estudio del Uso de Animales en Investigación Científica[2], que ha puesto en marcha un Acuerdo de transparencia sobre el uso de animales en experimentación científica en España, al que se han adherido **153 sociedades científicas, centros de investigación, universidades y asociaciones de pacientes**, comprometidos a compartir con la sociedad de forma transparente la manera en la que utilizan animales en experimentación. La adhesión a este acuerdo con carácter voluntario, sirve para dar idea de la preocupación que existe en la comunidad científica por explicar a la sociedad la importancia de la experimentación animal.

"Hay cientos de ejemplos de por qué la experimentación animal ha salvado vidas en el pasado y seguirá siendo necesaria para salvar vidas en el futuro".

El "por qué" es crítica la experimentación animal[1], lo ha explicado recientemente y de manera magistral EARA *(European Animal Research Association)*. Un ejemplo reciente con el que todos nos podemos identificar son los ensayos clínicos de las vacunas para la COVID-19[2]. Estas vacunas fueron inicialmente diseñadas utilizando **células en cultivo**, pero es evidente que antes de pasar a los ensayos clínicos en personas, su potencial toxicidad tuvo que ser descartada en animales. Si estas vacunas hubieran tenido efectos nocivos por ejemplo en el bazo, donde se producen las células generadoras de los anticuerpos contra el virus SARS-Cov-2 causante de la COVID-19[4], se hubieran detectado en estos ensayos en animales antes de tratar a personas[5]. Podéis leer el artículo completo en https://www.phmk.es/opinion/la-experimentacion-animal-en-biomedicina

1. https://cosce.org/comunicado-de-la-comision-cosce-de-estudio-del-uso-de-animales-en-investigacion-cientifica/
2. https://cosce.org/comision-cosce-de-estudio-del-uso-de-animales-en-investigacion-cientifica/
3. https://www.eara.eu/post/feature-animal-research-saves-lives-so-why-do-opponents-say-it-is-ineffective
4. https://www.phmk.es/farmacia/el-741-de-los-espanoles-se-vacunaria-contra-la-covid-19-en-la-farmacia
5. https://www.phmk.es/i-d/cientificos-gallegos-investigan-la-metastasis-a-traves-de-modelos-animales-marinos

Recuperando conexiones

Palabras clave: Alzheimer, genética, ratón.

En este artículo que destacamos, Gemma Marfany, catedrática de Genética en la Universitat de Barcelona nos explica su vinculación con el estudio de uno de los genes causantes de la enfermedad de Alzheimer.

Hace 20 años, muchos laboratorios del mundo trabajaban para identificar la causa molecular de la enfermedad a fin de comprender el proceso degenerativo característico que muchas personas sufren a partir de una cierta edad, y para intentar encontrar algún tratamiento efectivo que detuviera la progresión de una enfermedad de pérdida cognitiva que tanto impacta a nuestra sociedad. En los congresos, la gente se dividía entre los que creían que la causa de la enfermedad era la acumulación aberrante y tóxica de la proteína beta-amiloide en el cerebro, y los que creían que la causa era la acumulación de ovillos de proteína tau hiperfosforilada en las neuronas; ya que ambos tipos de proteínas tóxicas eran detectadas en los cerebros de los enfermos de Alzheimer *postmortem*.

La respuesta llegó de manos de la genética. Una de las maneras de poder estudiar cuáles son los cambios que hay en las neuronas y el cerebro de los enfermos de Alzheimer era generar **un modelo animal murino**, que permitiera estudiar el proceso de neurodegeneración.

Aunque tenemos muchas técnicas de transgénesis y manipulación del genoma de ratón, no es nada fácil generar modelos de neurodegeneración de inicio tardío (el Alzheimer en humanos se manifiesta en edades avanzadas). El ratón, como mucho, vive entre dos y tres años, con lo que solo si acumulamos mutaciones muy severas en diferentes genes (cosa que en los pacientes no pasa), podemos recrear un modelo que se parezca. Así, se introdujeron dos genes humanos con mutaciones: el de la proteína precursora del beta-amiloide, y el de la presenilina para acelerar el proceso. Para generar los ovillos de tau hiperfosforilato, se generó **otro modelo de ratón**, denominado doble *knock-in* humanizado, en el que se sustituyeron los genes sanos de ratón que codifican para la proteína beta-amiloide y la proteína tau, por los equivalentes humanos con mutaciones.

Hasta ahora, muchos tratamientos potenciales que se han ido desarrollando han intentado evitar la acumulación de las proteínas tóxicas. Aunque parecía que en ratones podían funcionar, frustrantemente no daban el mismo resultado en humanos. **Se abre una puerta a la esperanza**, investigadores de la Universidad de Yale han publicado, este junio en la revista *Science Translational Medicine*, un trabajo donde han comprobado que usando un modulador silencioso del receptor de glutamato (denominado BMS-984923) consiguen detener este proceso de destrucción neuronal. Como las sinapsis se van generando y reabsorbiendo de forma dinámica, **lo que consigue este tratamiento es equilibrar de nuevo el sistema, haciendo que se generen nuevas sinapsis, de forma que no solo se detiene el proceso de destrucción sino que se producen nuevas, reactivando las conexiones.** Han comprobado que eso es así con múltiples ensayos sobre los dos modelos de ratón, demostrando que detienen también la deposición de las proteínas tóxicas beta-amiloide y tau hiperfosforilada.

Coincidiendo con la publicación de estos resultados del equipo de la Universidad de Yale, ha acabado un **ensayo clínico en fase I** con 36 pacientes sanos (sin ningún déficit o pérdida cognitiva) de entre 50 y 80 años. Todavía no se han publicado los resultados, pero seguro que no tardarán en hacerlo. Recordamos que no lo han hecho en pacientes, sino en personas sanas para evaluar seguridad de las dosis; con lo que tendremos que esperar para saber si este tratamiento puede ser tan prometedor y efectivo como parece en los animales del modelo.

- https://www.elnacional.cat/es/opinion/recuperando-conexiones_767811_102.html
- https://news.yale.edu/2022/06/01/experimental-drug-reverses-synaptic-loss-mouse-models-alzheimers

En nuestro
animalario,
primero
el bienestar
animal
sociedad española
para las ciencias
del animal de laboratorio
www.secal.es

ANIMALES DE LABORATORIO
VERANO 2022 / NÚMERO 94

Web de investigación con animales en la Universidad Complutense de Madrid (UCM): ejemplo de transparencia y comunicación del uso de los animales en investigación

María Pilar Bringas de la Lastra e Ignacio Álvarez Gómez de Segura
Universidad Complutense de Madrid

Palabras clave: Cultura del Cuidado, buenas prácticas de trabajo, equipo humano-animal.

INICIOS

La investigación con animales sigue siendo imprescindible para el avance del conocimiento biomédico y de mejora de la salud humana y veterinaria, al igual que del medio ambiente. Mientras se buscan métodos alternativos y validados al uso de animales, estos seguirán siendo esenciales. La experimentación animal debe siempre desarrollarse dentro de la normativa vigente que regula y protege el uso de los animales en investigación y en el ámbito del compromiso con la Cultura del Cuidado que garantice las buenas prácticas de trabajo y minimice el impacto sobre los animales.

La creciente preocupación social en torno al uso de los animales en investigación exige que los investigadores informen al público sobre el trabajo que realizan y los objetivos perseguidos, con el fin de que la sociedad lo comprenda y asuma, siendo además ésta la principal beneficiaria de los logros obtenidos.

La Universidad Complutense de Madrid (UCM) está comprometida con los principios éticos que deben velar por el bienestar de los animales utilizados en investigación y docencia. Este compromiso de informar y comunicar de manera transparente la investigación implica detallar: qué se realiza en la UCM utilizando animales, cómo se hace, y porqué es necesario el uso de estos animales en determinados proyectos de investigación.

En el año 2016 la UCM se hizo miembro de EARA (del inglés, *European Animal Research Association*), organización que pretende informar a la sociedad para que comprenda y reconozca los beneficios que la investigación con animales tiene en el ámbito biomédico y el desarrollo sanitario en Europa. Esta asociación plantea sus acciones con una clara apuesta por la transparencia y asesora a instituciones como la UCM para lograrlo. Con dicho asesoramiento en la búsqueda de mecanismos eficaces, la UCM se comprometió a informar y educar al ámbito universitario –pero también a la sociedad– sobre el uso de animales en investigación en nuestra institución, promoviendo un debate transparente.

PÁGINA WEB

El primer paso para alcanzar estos objetivos fue la creación de una página web específica de transparencia en investigación animal en la UCM. Son pocos los ejemplos de enlaces web que abordan estos temas en instituciones de investigación españolas, tanto públicas como privadas, siendo más numerosos en otros países europeos. Los enlaces disponibles en otras instituciones nos han servido de referencia para hacer una propuesta adaptada a las características de la UCM y con el asesoramiento antes indicado de EARA dada su experiencia.

Objetivos y Contenido

Para empezar a generar el enlace web se plantearon en primer lugar los objetivos que perseguíamos. Estos incluían características como su sencillez, claridad, accesibilidad y que estuviera dirigida a toda la sociedad en su conjunto, no solo al ámbito científico o universitario. Las pautas planteadas fueron las siguientes:

- Página fácil y rápida de encontrar a través de los buscadores más conocidos.

- Página sencilla, en la que el acceso a la información o página de interés se hiciera en máximo tres clics, sin abusar de páginas "hijas" que dificulten la navegación y acceso a la información.

- Utilizar un lenguaje sencillo, correcto y no muy técnico, es decir legible por parte de la sociedad en su conjunto.

Priorizar la inclusión de imágenes y videos ilustrativos, más atractivos que un texto extenso, y que permiten transmitir información e ideas complejas de forma más sencilla.

Una vez pautadas, el siguiente paso fue elaborar un índice de contenidos considerados necesarios para proporcionar la información de forma transparente (ver Figura 1), para luego poder desarrollarlos. Se consideraron los siguientes elementos o contenidos imprescindibles:

- Declaración institucional de la UCM de compromiso con la transparencia en experimentación animal.

- Principios éticos que velan por el bienestar animal asumiendo la responsabilidad del cumplimiento de la norma de las 3Rs.

- Cómo y por qué se usan animales de experimentación en la UCM.

- Principales líneas de investigación de la UCM en las que se usan animales.

- Actualización de las noticias relevantes en experimentación animal.

- Preguntas frecuentes.

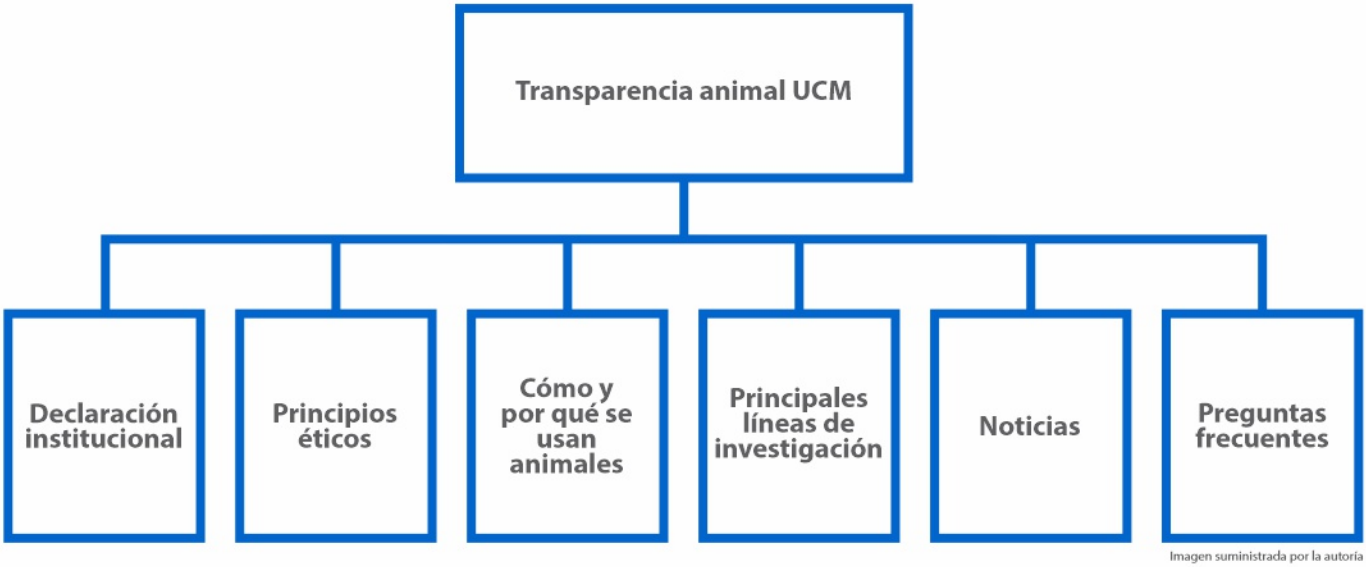


Imagen suministrada por la autoría

Figura 1.- Estructura de la página web de transparencia animal de la UCM.

Para el desarrollo del enlace web contamos con el Departamento de Análisis de la Comunicación de la Facultad de Periodismo y la Plataforma de contenidos audiovisuales y digitales de nuestra universidad. Ambos nos ayudaron a plasmar las ideas y pautas en la web. La intervención de personas ajenas al mundo de la experimentación animal resultó ser de gran valor, ya que eran unos buenos referentes para confirmar la legibilidad del enlace web por parte de la población general, además de cumplir con los objetivos de transparencia que estábamos buscando.

Un aspecto a considerar a la hora de elaborar la estructura y contenidos del enlace web fue que debía ajustarse a las líneas directrices para la configuración de las páginas web institucionales.

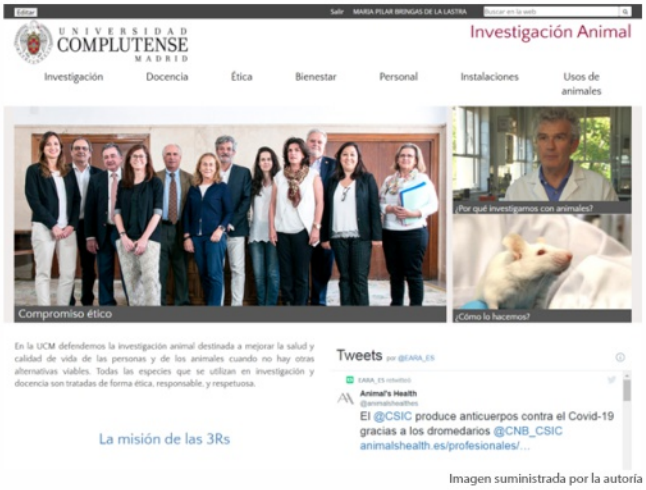


Imagen suministrada por la autoría

Figura 2.- Página principal de la web de transparencia de la UCM.

Estructura de la página

Declaración institucional: el Compromiso Ético.

Consideramos que una declaración institucional explicita las intenciones y compromiso de la institución y resulta imprescindible. La inclusión de una imagen del equipo (ver Figura 2) identifica además a las personas que representan el compromiso ético de la UCM.

Para dar un apoyo gráfico se incluyen dos videos donde un investigador de la Universidad explica las razones por las que se usan animales en investigación, pero también otro que explica cómo se hace, y quizás los elementos básicos que justifican dicho uso. Entendemos que debemos explicar el empleo de los animales en los experimentos y justificar su necesidad obteniendo unos resultados de valor para la sociedad, es decir un balance ético.

Otro elemento, gráfico, es el principio de las 3Rs que rige la investigación animal en Europa, y el compromiso de transparencia de la UCM, fortalecido por el acuerdo COSCE de transparencia y el apoyo de EARA.

Esta última proporciona una de las partes más relevantes, por su actualidad, pero también más difícil, por la necesidad de una renovación permanente. Esta asociación incluye un vínculo tweet que se actualiza prácticamente a diario, y ayuda a mantener la página activa con las últimas noticias relacionadas con la investigación con animales (ver Figura 3).

Imagen suministrada por la autoría

Figura 3.- Ejemplo de noticias de EARA.

Finalmente, no podía faltar un enlace a las preguntas frecuentes (FAQs), que desarrollan mediante preguntas concretas respuestas sencillas relacionadas con las razones por las que se emplean animales en investigación y el compromiso de la UCM para que se realice de la forma ética que corresponde y se exige.

La investigación en la UCM

La descripción de las investigaciones que realiza la UCM constituye la mejor forma de demostrar el uso correcto de los animales, no solo porque se realizan bajo una normativa y han sido autorizadas, sino porque tiene su reflejo en el avance de la ciencia y en los beneficios para la sociedad y otros animales. En la UCM existen grupos del más alto nivel en áreas como la biomedicina y el estudio de enfermedades como el Alzheimer, el ictus, la demencia, la salud metal o enfermedades parasitarias que afectan a personas y animales. Otros campos son la biología y el bienestar animal, por ejemplo, de peces. Esta página incluye otras noticias de investigación de la UCM que implican el uso de animales, pero también las estadísticas de uso de los mismos en su conjunto.

La docencia en la UCM

La universidad es un espacio de investigación y docencia, pero el uso de animales en este último caso es muy restringido, y se centra fundamentalmente en las facultades de veterinaria. En la UCM la docencia con animales está basada en el manejo de pacientes veterinarios que acuden al hospital clínico veterinario, o el de animales alojados en la granja de la facultad. El uso de animales de experimentación ha descendido considerablemente en los últimos años siendo sustituidos por el empleo de simuladores o técnicas alternativas.

Principios éticos y Bienestar animal

El buen uso de los animales se basa no solo en principios normativos sino éticos. En esta página se describen brevemente dichos principios incluyendo un video explicativo del responsable institucional.

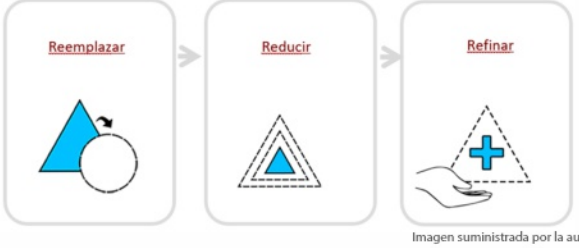


Imagen suministrada por la autoría

Figura 4.- Principio de las 3Rs en experimentación animal.

Un enlace independiente plantea la relevancia de las 3Rs y lo que significa cada una (ver Figura 4). La página está apoyada por el video institucional de la SECAL.

Personal e Instalaciones

Dado que toda persona que maneje animales en investigación o docencia debe disponer de una formación previa obligatoria, este aspecto relevante y casi único, se explica en un enlace independiente. También se enfatiza que es obligatoria una actualización permanente, de forma que la sociedad entienda el compromiso con los animales para proporcionarles los mejores cuidados por personal especializado.

Otra página también explica el carácter especial de las instalaciones en las que se alojan los animales y la relevancia del enriquecimiento (ambiental o físico y emocional) que promueva su bienestar.

Estadística de uso de animales

La Unión Europea pública, en un compromiso claro de transparencia, cuantos animales son empleados y las características de los mismos y las investigaciones en las que se manejan. Los datos específicos de la UCM publicados periódicamente muestran los datos más relevantes y son actualizados a medida que salen nuevos datos. Actualmente, se muestran los datos del periodo 2019 y 2020 mostrando la evaluación del uso de animales en nuestra institución (ver Figura 5).

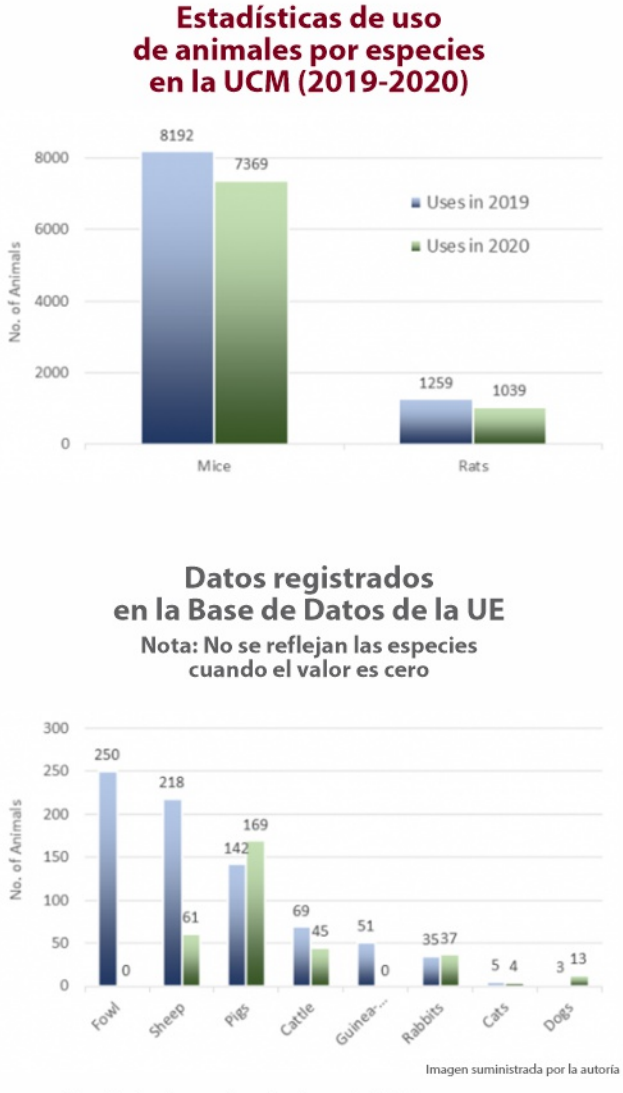


Imagen suministrada por la autoría

Figura 5.- Estadística de uso de animales en la UCM.

ANIMALES DE LABORATORIO
VERANO 2022 / NÚMERO 94

La microinyección de embriones y el paso del tiempo: desde la transgénesis aditiva a la edición genómica

Melani Margullón
Servicio Transgénesis CNB-CBMSO, CSIC

Palabras clave: gen, KO/KI, transgénico.

INTRODUCCIÓN

La modificación genética se refiere a las técnicas diseñadas para obtener inserciones al azar o en zonas específicas, deleciones y mutaciones puntuales en el genoma con el fin de crear organismos genéticamente modificados (OGM), es decir, podremos añadir o suprimir genes en un organismo y así observar y entender su funcionamiento. También permite la creación de modelos animales "humanizados" para el estudio de fármacos y nuevas terapias.

Desde el primer animal modificado genéticamente, en los años 80, con la microinyección (MI) de ADN en embriones de una célula, hemos visto un gran avance en la tecnología implicada, con la incorporación de nuevas estrategias como la mutagénesis dirigida con células ES o la edición genómica con ZNFs, TALENs o CRISPR/Cas9.

Dependiendo del tipo de estudio o de modelo animal que se busque hay diferentes estrategias de modificación genética. La transgénesis aditiva busca aumentar la expresión de algún gen o que un animal exprese un gen que no tiene en condiciones naturales y lo hace mediante la inserción al azar de un transgén. En otros casos queremos modificar un gen específico, bien evitando que funcione (animal KO) o buscando que lo haga de una forma diferente (animal KI) e incluso controlando dónde y cuándo funciona (animal condicional). Estos 3 modelos se pueden conseguir mediante mutagénesis dirigida usando células ES, o recurriendo a la tecnología de edición genómica con CRISPR/Cas9.

A pesar de los más de 40 años de modificación genética y las diferentes estrategias, la MI sigue siendo una metodología totalmente vigente y en este artículo quiero compartir cómo ha cambiado nuestro Servicio de Transgénesis, en cuanto a equipamiento y técnicas usadas, a lo largo de los últimos años, y cómo realizamos las microinyecciones.

MATERIAL

- Medio KSOM + aminoácidos (aa).
- Aceite mineral.
- Puntas de pipeta y micropipetas.
- Placas Petri.
- Material quirúrgico.
- Porta excavado.
- Medio M2.

METODOLOGÍA

Lo primero que debemos hacer es preparar las placas de MI. Utilizamos dos placas por sesión, una de 35 mm y otra de 60 mm. La preparación de la placa siempre se hace con puntas estériles y en la cabina de flujo laminar para evitar contaminaciones. Rotulamos ambas placas en la tapa con la fecha. En la placa de 60 mm rotulamos los números del 1 al 8 por el exterior de la parte inferior.

Una vez rotuladas, echamos 3 ml de medio de cultivo de embriones KSOM + aa en la placa pequeña. En la grande, pondremos microgotas de 80 µl por encima de cada número rotulado (8 en total) y cubriremos con aceite mineral (ver Figura 1). La placa pequeña se utiliza para lavar los embriones en medio de cultivo antes de colocarlos en las gotas de la placa grande.

Una vez preparadas, las placas se meten en un incubador a 37ºC, CO_2 al 5% y 100% de humedad para que el KSOM se equilibre al menos durante 2 horas.

Esto lo hacemos así porque inyectamos unos 150-200 embriones por sesión (inicialmente todos se colocan en la gota 1). Conforme se van inyectando, en grupos de 30-40, cada tanda se coloca en las siguientes microgotas (2 a 8) hasta terminar la sesión sin

mezclarlos. De esta manera podemos llevar un control de las etapas de la microinyección y determinar la lisis que produce a los embriones el pinchazo y la posible toxicidad de la solución inyectada.

Es muy importante que entre tandas de inyección se meta la placa de cultivo en el incubador para evitar que las gotas se desequilibren, ya que fuera del ambiente de CO_2, el pH varía, pudiendo llegar a ser tóxico.

En cada sesión llevamos un control detallado con una ficha en la que se apunta la hora de inicio y fin de cada tanda de inyección, el número de embriones inyectados y la lisis final de cada gota.

Imagen suministrada por la autoría

Figura 1.- Placas de MI.

Una vez preparadas las placas y colocadas en el incubador procedemos a extraer los embriones que vamos a inyectar de hembras donantes, para ello, las hembras son previamente superovuladas con eCG (gonadotropina coriónica equina, la cual induce la producción y maduración de gran cantidad de ovocitos) y hCG (gonadotropina coriónica humana, que induce la ovulación). Con este tratamiento buscamos aumentar el número de embriones obtenidos por cada animal, reduciendo así el número de hembras utilizadas.

En el caso de inyectar embriones en fase de 1 célula (ver Figura 2), a las 17-19 horas tras la administración de la hormona hCG y el cruce con el macho, se sacrifican las hembras mediante dislocación cervical. Esta fase se utiliza tanto para la inyección pronuclear (ADN o CRISPR/Cas9) como citoplasmática (CRISPR/Cas9). En el caso de inyección de células ES, en nuestro servicio utilizamos como embriones receptores el estadio de 8 células (ver Figura 3). Esta fase se recoge el día 2,5 (48 horas después de haber visualizado el tapón vaginal).

Imagen suministrada por la autoría

Figura 2.- Embrión en fase de 1 célula.

Imagen suministrada por la autoría

Figura 3.- Embrión en estadio de 8 células.

Todas las técnicas de MI requieren el uso de dos brazos de micromanipulación acoplados a un microscopio invertido. En el servicio disponemos de dos equipos, uno más antiguo con un brazo eléctrico y otro hidráulico (ver Figura 4), y otro con ambos brazos eléctricos con función combinada de macro y micromanipulación (ver Figura 5).

Imagen suministrada por la autoría

Figura 4.- Microscopio con micromanipulador eléctrico (izquierda) e hidráulico (derecha).

Imagen suministrada por la autoría

Figura 5.- Microscopio con micromanipuladores eléctricos.

La micromanipulación se realiza en el microscopio y nosotros utilizamos para ello un porta de cristal excavado que se prepara de la siguiente manera: en el porta, previamente siliconizado, se coloca en el centro de la depresión una gota del medio que utilizamos para el lavado de los embriones, M2. A diferencia del KSOM, el M2 no necesita equilibrarse con CO_2 para mantener el pH. La gota de medio se cubre con aceite mineral (ver Figura 6), y colocamos en ella los embriones que se van a inyectar en una media hora (30-40) y que sacaremos en este momento de la placa de cultivo que tenemos en el incubador. Los embriones se lavan antes en una placa abierta con M2 para retirar los restos de KSOM y una vez depositados en la gota, lo llevamos al microscopio.

Los embriones se mantienen como máximo 30-40 minutos en el microscopio para evitar que el medio de la gota se vuelva tóxico con el aumento de la presión osmótica, debido a la evaporación que se produce, a pesar de estar cubierta de aceite.

Imagen suministrada por la autoría

Figura 6.- Porta excavado con M2 recubierto de aceite mineral.

La aproximación y colocación de las agujas o pipetas se hace a 40-50 aumentos, la inyección, en nuestro caso, se hace a 200x.

Con la pipeta de sujeción (Holder), a la que se aplica una presión negativa, fijamos los embriones uno a uno para que no se muevan al inyectarlos con la pipeta (o aguja) de microinyección (ver Figura 7).

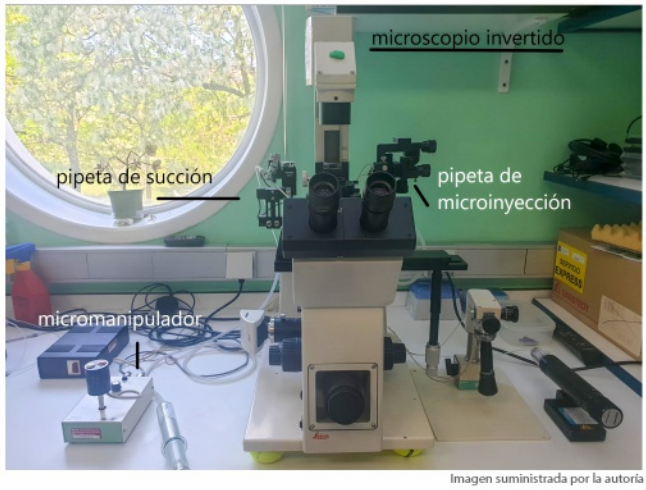


Imagen suministrada por la autoría

Figura 7.- Partes de un micromanipulador.

Una vez que tenemos fijado el embrión con la orientación adecuada, que permita visualizar los pronúcleos, sólo será necesario inyectar el transgén o el combinado de ribonucleoproteína y ADN donante si optamos por la estrategia de CRISPR/Cas9. En este último caso el lugar de la MI puede ser en el pronúcleo o en el citoplasma (ver Figura 8A), ajustando las concentraciones utilizadas en cada localización.

La inyección se realiza con una aguja o pipeta de inyección mediante presión positiva, que se consigue conectándola a un microinyector manual o automático que desplaza aire. Si lo que se inyectan son células, la pipeta de inyección cambia de características, siendo mucho más ancha para poder alojar las células (ver Figura 8B).

En este caso, como hace falta un control mucho más preciso del movimiento de las células ES en la pipeta, utilizamos un microinyector cargado con aceite mineral en vez de aire y que por su gran densidad hace que el desplazamiento sea mucho más lento.

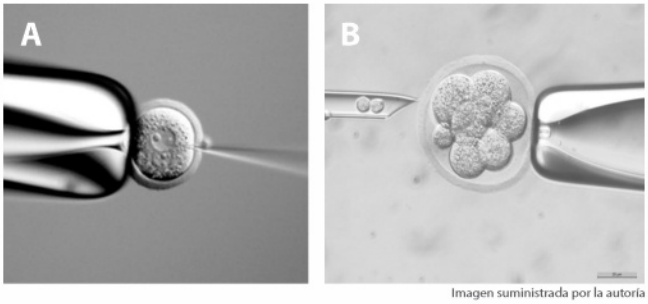


Imagen suministrada por la autoría

Figura 8.- Técnica de Microinyección. **A.** Inyección CRISPR/Cas9 en citoplasma en embriones de 1 célula. **B.** Inyección de células ES en embriones de 8 células.

En el caso de los embriones de 1 célula, los dejaremos aproximadamente dos horas en la estufa para poder comprobar más tarde la tasa de supervivencia de los mismos. En este tiempo se puede apreciar la lisis, pero no permite evaluar la toxicidad de la solución inyectada, ésta requiere cultivar los embriones por lo menos hasta el día siguiente y confirmar el paso a 2 células.

La transferencia puede hacerse a partir de las 2 horas si ya hemos comprobado que la solución inyectada y las concentraciones utilizadas no son tóxicas. Este punto se evalúa en cada nuevo proyecto.

En nuestro servicio, si la MI se realiza en pronúcleos y la solución lleva ADN, como es el caso de proyectos para obtener transgénicos, transferiremos no menos de 20-25 embriones, mientras que, si se ha inyectado en el citoplasma, podemos bajar el número a 17-20 embriones.

Aunque las modificaciones genómicas basadas en el uso de células ES fueron toda una revolución, actualmente el método más eficiente y rápido para generar los animales KO/KI y condicionales es el sistema CRISPR/Cas9.

Nuestro servicio ha sido un testigo más de esta evolución. Analizando el trabajo de los últimos años, hemos podido comprobar que los proyectos con células ES han bajado considerablemente, siendo sustituido por los proyectos con CRISPR, tal y como recogen la Tabla 1y la Figura 9. Las razones son claras, con CRISPR ya no se necesita un laboratorio específico para generar los clones de las células, ni necesitamos tanto tiempo para generar los animales, lo que con células ES requiere un mínimo de 12 meses, puede conseguirse en 6 con CRISPR.

Tabla 1.- Datos recogidos en el servicio sobre proyectos realizados a partir de MI de DNA, CRISPR/Cas9, Células ES y EZZ.

Año	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021
ADN	12	10	6	3	4	5	5	4
CRISPR	2	3	7	10	10	9	3	3
CÉLULAS ES	7	7	5	3	2	0	0	3
EZZ	0	0	0	0	2	4	0	0

Imagen suministrada por la autoría

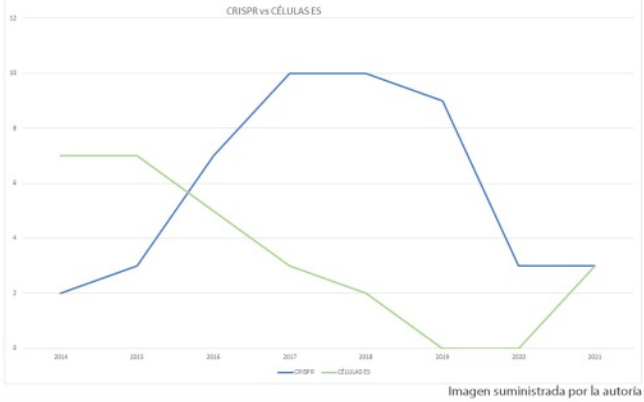


Imagen suministrada por la autoría

Figura 9.- Comparativa de proyectos a partir de células ES o CRISPR/Cas9.

La microinyección sigue siendo una técnica plenamente vigente, pero en ciertos casos puede sustituirse de forma eficaz por la electroporación, que se realiza con un electroporador (EZZ) (ver Figura 10), cuya función es generar un campo electromagnético, provocando un aumento de la conductividad y permeabilidad de la membrana de los embriones, es decir, abre los poros, y así facilita la entrada del material genético nuevo. Esta técnica es muy rápida, muy eficiente y apenas causa muerte embrionaria, sin embargo, aún está lejos de poder reemplazara la MI, debido a que por este sistema sólo podremos introducir ADN de pequeño tamaño (200-300 pares de bases, pb), mientras que la MI permite insertar en el embrión fragmentos de tamaño mucho mayores, que pueden llegar hasta 500-4000 pb.

Imagen suministrada por la autoría

Figura 10.- Electroporador.

CONCLUSIONES

Por esto, como conclusión, podemos decir que a día de hoy, ningún laboratorio que se dedique a generar modelos animales puede prescindir de la técnica de microinyección.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Verónica Domínguez y Belén Pintado del Servicio de Transgénesis CNB-CBMSO su ayuda en la redacción de este artículo.

Más de 400 socios relacionados con el sector de los animalarios

Anúnciate en nuestra revista

publicidad.revista@secal.es

sociedad española para las ciencias del animal de laboratorio

Low-flow electronic vaporizers

SomnoFlo®

Like traditiional, but better

Features & Benefits of Low-Flow

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

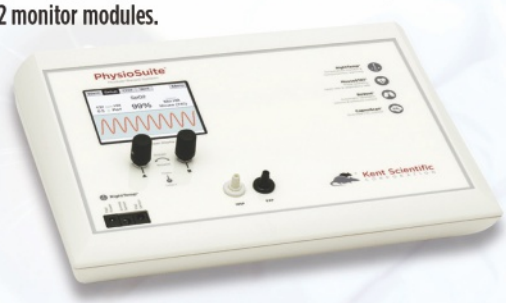
SomnoSuite®

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

Physiological monitoring

PhysioSuite®

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



Features & Benefits

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

Noninvasive blood pressure monitors

CODA®

CODA Monitor - 1 Animal

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

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

Kent Scientific
CORPORATION

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

El uso de extintores de polvo químico seco en Animalarios

Hace unos días, desde la redacción del Observatorio de Prevención de Riesgos y Accidentes (OPRA) reflexionaban sobre la idoneidad del uso de extintores de polvo A-B-C en interiores; por tanto, siguiendo su reflexión, la ampliamos al mundo de la experimentación animal.

Jesús Martínez Palacio
Técnico Superior en Prevención de Riesgos Laborales

Palabras clave: extintores, polvo químico, polvo A-B-C.

Hace unas semanas, una mujer resultó con lesiones asociadas al uso de un extintor de polvo seco A-B-C[1] (ver Figura 1) que utilizó para sofocar un incendio en el horno de su cocina. No es el primer accidente de este tipo.

Imagen suministrada por la autoría

Figura 1.- Típico extintor de polvo A-B-C.

Este tipo de extintores, si alguna vez los habéis utilizado, generan tres problemas fundamentales si los utilizamos en interiores:

- Reducción de la visibilidad (puede llegar a entorpecer la evacuación u otras acciones necesarias).
- Suciedad. Solo los que hemos tenido que disparar uno de estos extintores sabemos el tiempo y trabajo que requiere la posterior limpieza de la zona.
- Efectos colaterales. Si, apagan el fuego, pero pueden afectar a equipos e instalaciones; tienen una posible toxicidad potencial; y los alimentos, lechos u otros objetos en contacto con el mismo deberían ser desechados.

Todo ello se debe a sus características:

- El polvo seco es muy fino y tiene una gran capacidad de penetración en el interior de cualquier equipo u objeto presente.
- Genera una enorme nube de polvo en suspensión.
- Es ligeramente alcalino y absorbe humedad. Si no se limpia rápidamente puede generar corrosión en algunos equipos y objetos. Esto puede ser crítico en equipos eléctricos, electrónicos y maquinaria. Y en presencia de animales.
- Hay diversas normas y estándares que no recomiendan su uso en interiores[2], o como las NFPA 75 y 76 para la protección de Salas de Computadores y Centrales Telefónicas, que directamente prohíben su uso en equipos electrónicos (cada día más comunes en nuestros Animalarios).
- Su uso induce a la contaminación de los alimentos y lechos presentes que deberán ser desechados.
- La limpieza después de la descarga tiene un elevado coste laboral y económico[3].

Paradójicamente, los extintores de polvo químico seco Clase A-B-C son los más frecuentes en España y se pueden encontrar prácticamente en cualquier tipo de recinto: oficinas, hospitales,

viviendas, hoteles, escuelas, etc. Y, por supuesto, son muy comunes en los Animalarios (ver Figura 2) .

Posiblemente se asocie a los requerimientos del Código Técnico de Edificación, que este tipo de extintores cubren sobradamente. Aunque en el caso de los Animalarios cabe preguntarse si se estudiaron las posibles repercusiones de su uso.

Imagen suministrada por la autoría

Figura 2.- Boca de Incendio Equipada (BIE) y extintores de polvo A-B-C y de CO_2 en el pasillo de evacuación del animalario.

Existen alternativas al extintor de polvo. Normalmente, se podría contar con extintores de CO_2 o hídricos (ver Figura 3) (solo agua o con espumas), que serían sustitutivos ideales del polvo seco para equipos eléctricos/electrónicos delicados –en el caso del Co_2– y para fuegos de materiales secos en el caso de los extintores hídricos.

Imagen suministrada por la autoría

Figura 3.- Extintores de CO_2 en el Animalario.

Un análisis de los riesgos a proteger y, también, de los posibles daños que pueda producir su instalación y uso debería ser la base de la elección y ubicación de los tipos de extintores en nuestras instalaciones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Las iniciales A-B-C hacen referencia a los tipos o clases de fuegos que corresponden a:

   - Clase A: SÓLIDOS. Incendios que implican sólidos inflamables que normalmente forman brasas y que son, generalmente, de naturaleza orgánica: madera, tejidos, goma, papel, algunos tipos de plástico...

   - Clase B: LÍQUIDOS. Incendios que implican líquidos inflamables: petróleo, gasolina, aceites, pintura, alcohol y sólidos licuables como la parafina, el asfalto, algunas ceras y plásticos...

   - Clase C: GASES. Incendios que implican gases inflamables: metano o gas natural, hidrógeno, propano, butano, acetileno...

2. Esto es lo que ocurre reglamentariamente en países como el Reino Unido, donde específicamente el *British Standard BS 5306* (Cláusula 5.4.3) limita el uso de los extintores de polvo a exteriores o situaciones donde un estudio de riesgos establezca que no se puede utilizar otro tipo de extintor.

En traducción libre: *"La descarga de un extintor de polvo en el interior de edificios puede causar una repentina reducción de la visibilidad y también dificultar la respiración, lo que podría dificultar durante un tiempo la evacuación, rescate u otras actuaciones de emergencia. Por esta razón, los extintores de polvo no deberían de forma general ser especificados para su uso en interiores, a menos que sea indicado por una evaluación del riesgo de seguridad y salud."*

Dry Powder Extinguishers – not recommended for Indoor Use

The 2012 edition of BS 5306:Part 8 – Selection and Positioning of Portable Fire Extinguishers contains the following clause:

5.4.3 Use of powder extinguishers

The discharge of a powder extinguisher within buildings can cause a sudden reduction of visibility and can also impair breathing, which could temporarily jeopardize escape, rescue or other emergency action. For this reason, powder extinguishers should generally not be specified for use indoors, unless mitigated by a health and safety risk assessment.

3. El consultor británico Mr. John Webb para la prevención de incendios en *St. Albans Diocesan Advisory Committee ontheCare of Churches* refiere un caso de la descarga por un acto de vandalismo de un solo extintor de polvo en el interior de una iglesia que causó un coste para los aseguradores de 250.000 Libras Esterlinas.

PARA SABER MÁS

- https://www.elespanol.com/quincemil/articulos/actualidad/una-mujer-herida-por-inhalar-polvo-de-un-extintor-en-un-incendio-en-a-laracha-a-coruna
- https://opra.info/

LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL DA VIDA

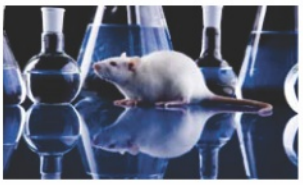
sociedad española para las ciencias del animal de laboratorio

www.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
www.steriltech.net

steriltech

INSTRUMENTACIÓN E INSTALACIONES CIENTÍFICAS



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

bioquell
An Ecolab Solution

SAS Biológico

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

SAS Ventilado

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

Bioquell ProteQ

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

Bioquell BQ50

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

Bioquell L-4

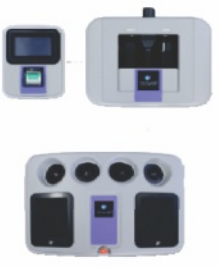
Generador de VPH móvil. Ideal para salas, aisladores, RABS, cabinas, etc.

Bioquell IG-2

Solución integrada con su equipo y proceso operativo.

Bioquell SeQure

Sistema fijo montado en pared.



Asilador Qube

Espacio de trabajo aséptico y personalizable con GPHV integrado.

BMT
MMM Group

bmt@bmtiberia.es
www.bmtiberia.es

Limitaciones actuales para investigación biomédica con primates no humanos en el escenario europeo

Elena Ciordia[1] y José Luis Lanciego[2,3,4]
[1] *Servicio de Experimentación Animal, Universidad de Navarra*
[2] *Programa de Neurociencias, Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA), Universidad de Navarra*
[3] *Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CiberNed)*
[4] *Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra (IdisNA)*

Palabras clave: NHP, Europa, legislación.

RESUMEN

Desde finales de 2018, han comenzado a aparecer dificultades para la importación de primates no humanos (NHPs, del inglés *non-human primates*) para su uso en investigación biomédica; dificultades que se han visto exponencialmente agravadas por la pandemia de SARS-CoV-2, y también como consecuencia de la prohibición del gobierno de la República Popular China para la exportación de NHPs. En paralelo, en el año 2017, la Comisión Europea publicó un estudio de viabilidad basado en los datos disponibles de los años 2016 y 2017, como paso previo al requerimiento de la Directiva Europea 2010/63/UE donde conforme al Artículo 10 y al Anexo II, se pretende prohibir el uso de animales F1 o no procedentes de colonias autosostenibles en la Unión Europea a partir del mes de noviembre de 2022, sin posibilidad de extensión de dicho plazo. Debido a los notables cambios internacionales que han tenido lugar desde la publicación del informe de viabilidad del año 2017, las previsiones de actualización de la Directiva Europea han quedado obsoletas, pero al continuar vigente el plazo de noviembre de 2022, en conjunto se dibuja un panorama muy preocupante de cara a mantener viable la experimentación biomédica con NHPs en Europa.

CONTEXTO

Aunque se calcula que los NHPs únicamente representan el 0,2% del total de animales empleados en investigación biomédica en Europa, su uso es indispensable para el desarrollo de nuevas terapias, ya sean farmacológicas o no, y más recientemente, vacunas. Dichos productos deben ser testados en modelos animales relevantes, de tal manera que su resultado sea predictivo de su eficacia y seguridad cuando sean trasladados a ensayos clínicos. De hecho, y, particularmente, en el caso de las enfermedades neurodegenerativas, los NHPs son la única especie animal realmente relevante para estudios en fases preclínicas finales. Más concretamente y habida cuenta de la proximidad genética entre NHPs y humanos, para el desarrollo de nuevos tratamientos bioterapéuticos, el empleo de NHPs es indispensable para productos de tipo inmunoterapias con anticuerpos, moléculas peptídicas, vacunas, hormonas y terapia génica. Resultados a obtener en otras especies animales no son tan relevantes habida cuenta de que con frecuencia desarrollarán anticuerpos neutralizantes frente al compuesto a ensayar.

Desde que se llevó a cabo el estudio de viabilidad en 2017[1], han aparecido diversas circunstancias no previstas que han conllevado un aumento en la demanda de NHPs, a la par de una reducción notable en cuanto a su disponibilidad. De un lado, todo lo referente a la pandemia SARS-CoV-2 ha impuesto un esfuerzo global para acelerar el conocimiento de dicho virus, así como la preparación de vacunas eficaces. En esta parte de la ecuación también hay que considerar el aumento en los esfuerzos para desarrollar medicinas biológicas (especialmente las relacionadas con anticuerpos para inmunoterapias y diferentes aproximaciones terapéuticas basadas en terapia génica). De otro lado, el embargo chino a la exportación de NHPs ha tenido igualmente un amplio impacto en la disponibilidad de estos animales, aspecto que junto con el incremento en la demanda de NHPs han ocasionado una tormenta perfecta. La República Popular China es el principal exportador de estos animales, representando algo más del 60% del total de los NHPs usados en EE. UU. (más de 20.000 NHPs exportados desde China a EE. UU. en 2019) y cerca del 30% en Europa. Además de dicho embargo,

China ha aumentado su propia demanda de estos animales e importando numerosos animales procedentes de otros países suministradores. Ambas situaciones han supuesto una presión añadida en los pocos proveedores existentes fuera del ámbito chino.

USO ACTUAL DE PRIMATES NO HUMANOS EN EUROPA Y DIFICULTADES DE LOS PROVEEDORES PARA SATISFACER LA CRECIENTE DEMANDA

EARA (del inglés, *European Animal Research Association*) llevó a cabo en febrero de 2022 una encuesta entre los 16 principales usuarios europeos de NHPs en la que también fueron consultados los proveedores europeos y africanos de estos animales. Los resultados de dicha encuesta revelaron que aproximadamente el 60% de los NHPs utilizados en los años 2020 y 2021 eran animales F1, y que en la mayoría de los centros usuarios el porcentaje de F1 variaba entre un 5% y un 40%.

Conforme al Artículo 10 de la Directiva Europea 2016/63/UE se llevó a cabo un estudio de viabilidad en 2017[1] (calculado basándose en las necesidades existentes en 2016 y 2017) el cual concluyó que sería posible emplear únicamente animales F2 o procedentes de colonias autosostenibles para el año 2022, sin necesidad de prolongar dicha fecha límite. Tanto las instituciones que para entonces continuaban usando animales F1 como los proveedores habituales, consideraron como factible el abandonar dichos animales y emplear únicamente animales F2 en ese plazo temporal, aunque únicamente en un escenario hipotético en el que no se viera incrementada su demanda.

La realidad que, actualmente, afrontan los proveedores implica que con frecuencia únicamente puedan facilitar animales con una edad inferior a 20 meses o con alguna anormalidad clínica. En ocasiones, algún proveedor ha tenido incluso que vender la totalidad de sus stocks de animales (incluyendo las parejas reproductoras), lo que dificulta aún más la consecución de colonias autosostenibles a corto y medio plazo.

Desde el año 2017 el gobierno de la Isla de Mauricio, donde están establecidos varios de los centros de cría que más animales suministran a Europa, ha autorizado la captura de animales salvajes (que allí son considerados como especies invasoras) con el fin de reducir los daños ocasionados en su biodiversidad, así como para reemplazar el stock de animales criadores. En este sentido, es necesario diferenciar entre animales reproductores ya retirados (muchos de ellos animales tipo F0) y animales capturados salvajes. La legislación actual no permite el empleo de animales salvajes capturados con fines de investigación biomédica, limitación que también aplica a los animales reproductores ya retirados que hayan sido mantenidos en cautividad durante al menos 10 años.

PROBLEMÁTICA A AFRONTAR

El Artículo 10 y el Anexo II de la Directiva Europea 2010/63/UE referente a la protección de los animales empleados con fines de investigación científica consideran que tras un periodo de transición adecuado, únicamente se podrán emplear los NHPs nacidos de animales criados en cautividad, definidos como animales F2 o procedentes de colonias autosostenibles. Debido a que como se ha señalado anteriormente este estudio de viabilidad se llevó a cabo en 2017 bajo unas circunstancias socio-económicas completamente diferentes a las actuales, se trata de un estudio obsoleto a fecha de hoy y que no puede sentar las bases para la prohibición del empleo de animales F1 a partir de noviembre de 2022. En la actualidad se está llevando un nuevo estudio, pero los datos obtenidos para el mismo se refieren a animales obtenidos/contratados antes de los cambios sustantivos producidos en el panorama internacional, por lo que si no se llevan a cabo otras acciones de alerta por parte de la comunidad científica, la información que la Comisión Europea evaluará, no será representativa de la realidad.

En este escenario, la investigación biomédica europea, tanto en el ámbito público como privado, necesita que la Comisión Europea comprenda adecuadamente la necesidad de garantizar el empleo de NHPs y que apoye el establecimiento de colonias criadoras en el espacio europeo que garantice la disponibilidad de NHPs. De manera similar a lo que ocurre en Estados Unidos, donde se dispone de siete *National Primate Research Centers* (California, Oregon, Southwest, Tulane, Washington, Wisconsin y Yerkes), sería muy necesario establecer al menos un centro europeo de similares características de manera tal que se pudiera garantizar el suministro de estos animales para investigación científica. Aunque no es una solución factible a corto plazo, debe ser implementada a la mayor brevedad y de hecho el gobierno francés ya está realizando pasos decididos en esta dirección. EARA ha remitido un informe a la Comisión Europea y facilitado su acceso a las autoridades competentes de los estados miembros en el que se describe la preocupación del sector científico.

Es además necesario considerar que fuera del espacio europeo, otros países con liderazgo en investigación biomédica tales como Estados Unidos, Canadá y China, habitualmente no afrontan

restricciones a la hora de emplear animales F1, situación que deja a la investigación biomédica europea en condiciones de inferioridad competitiva. Este hecho se agrava por el brutal incremento de precios de los animales (se han cuadriplicado en algunos casos), y los retrasos en los suministros que pueden paralizar proyectos ya aprobados y financiados con parámetros económicos antiguos. Conviene señalar que la mayor pérdida de competitividad la sufren los pequeños proyectos de centros académicos, muchos de ellos públicos, que no tienen los recursos de las grandes empresas.

De mantenerse esta situación, la investigación preclínica finalista con NHPs se verá inevitablemente trasladada a centros de investigación fuera de Europa, con los que difícilmente se puede competir en recursos humanos y disponibilidades presupuestarias. La pérdida será no solamente a nivel científico sino también a nivel de bienestar animal, ya que en Europa los estándares de cuidado y uso de animales son más exigentes que los de otros países. La única ventaja competitiva que los investigadores europeos mantenemos frente a estos países extracomunitarios es precisamente nuestra experiencia y *know-how* acumulados; los cuáles ante la obligatoriedad de ser externalizados a otros países, inevitablemente implican una pérdida de competitividad europea, no sólo relacionada con el desarrollo de nuevas medicaciones y de la propiedad industrial a generar por dicho nuevo conocimiento, sino que también incidirá muy notablemente en la pérdida de puestos de trabajo de personal con alta capacitación en beneficio de terceros países.

CONCLUSIONES

El escenario de investigación biomédica ha cambiado muy considerablemente en los últimos cinco años, dejando las previsiones establecidas en el Artículo 10 y el Anexo II completamente obsoletas por comparación con el panorama predictivo que se hizo cuando se llevó a cabo el estudio de viabilidad en 2017[1], y los datos obtenidos más recientemente de cara a la decisión a tomar en noviembre de este año. En consecuencia, urge que la Comisión Europea entienda la necesidad de un cambio de paradigma en su razonamiento, y al mismo tiempo una postura proactiva de cara a asegurar la resiliencia de la investigación biomédica europea en lo referente a la autonomía europea para la disponibilidad de NHPs a largo plazo.

Actualmente, Europa afronta cambios geopolíticos sin precedente en las últimas décadas. Carece por completo de sentido que Europa pretenda quedarse aislada de los recursos que necesita para impulsar adecuadamente la salud pública de sus ciudadanos y el sector científico biomédico europeo. A medio y largo plazo, el establecimiento de nuevas colonias de cría de NHPs en Europa, que garantice la disponibilidad de estos animales, es un aspecto de total necesidad a la hora de mantener el conocimiento y experiencia europeos líderes en este campo. Aunque no se trata de una solución a corto plazo, es el momento adecuado de empezar a sentar las bases de estas iniciativas que garanticen la independencia europea de terceros países. A corto plazo, es necesario reconsiderar las previsiones iniciales del informe de viabilidad (Artículo 10 y Anexo II) por ser poco realistas o factibles, habida cuenta de que se trata de un informe hecho en otro contexto socio-político completamente diferente y, actualmente, ya por entero obsoleto.

BIBLIOGRAFÍA

1. https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/related_topics/Article%2010%20Feasibility%20Study%20Final%20report%2031%20July%202017.pdf

En nuestro animalario,
primero el bienestar animal

Foto: Shutterstock

sociedad española
para las ciencias
del animal de laboratorio

www.secal.es

ANIMALES DE LABORATORIO
VERANO 2022 / NÚMERO 94

Vectores AAV: pequeños virus, grandes posibilidades

Elena Senís
Área de Laboratorio Biomédico, Anatomía Patológica y Farmacia, InstitutBonanova FP Sanitaria,Consoci Mar Parc de Salut de Barcelona

Palabras clave: virus adenoasociados, expresión génica, cápside.

INTRODUCCIÓN

Los vectores basados en virus adenoasociados (AAV, del inglés *adeno-associated virus*) son vectores de ADN que están siendo ampliamente utilizados en terapia génica[1]. Una de las principales ventajas de estos vectores es que poseen diferentes cápsides que les confieren un amplio abanico de tropismos a diferentes órganos y tipos celulares[2]. Además, los AAV no son virus patogénicos en humanos y los vectores derivados de ellos no se pueden replicar, lo que los hace inherentemente seguros para nosotros[3], convirtiéndolos en vehículos ideales en estrategias de terapia génica. De hecho, el primer medicamento de terapia génica aprobado en Europa, Glybera, consiste en un vector adenoasociado que contiene un gen para el tratamiento de la deficiencia de la lipoproteína lipasa, un trastorno hereditario raro que puede causar pancreatitis grave. En este artículo analizaremos la estructura del genoma de los vectores AAV, su amplia variedad de cápsides y las principales aplicaciones de estos vectores en animales de laboratorio.

ESTRUCTURA DEL GENOMA DE LOS VECTORES AAV

Los AAV son virus de ADN de la familia de los Parvovirus y son pequeños (unos 20 nm de diámetro) y sin envoltura. Son dependovirus, lo que significa que necesitan de otros virus *helper* (como los Adenovirus o los Herpex Simplex) para completar su ciclo de replicación[4]. Los AAV tiene un genoma de ADN de cadena simple de tan sólo 4,7 kilobases (kb) y tres marcos abiertos de lecturas (ORF, del inglés *open reading frame*) flanqueados por repeticiones terminales inversas (ITR, del inglés *inverted terminal repeats*)[5] (ver Figura 1). El primer ORF codifica para las proteínas Rep, proteínas no estructurales que se encargan de la replicación del ADN, de la expresión de genes, y de la integración y la escisión del genoma en el hospedador. El segundo ORF (Cap) codifica para las proteínas estructurales VP1, 2, y 3, que son las que constituyen la cápside del virus. Para formar la cápside, 60 de estas proteínas se ensamblan en proporción 1:1:10 (VP1:VP2:VP3) para formar un icosaedro. El tercer ORF ha sido descubierto recientemente y codifica para la proteína AAP, que es necesaria para el ensamblaje de la cápside[6], y para MAAP, una proteína que facilita la salida del virus de la célula[7]. Los ITR son secuencias de 145 nucleótidos en forma de horquilla que flanquean a estos tres ORF. Su función es hacer de auto-cebadores durante la replicación del genoma permitiendo generar una segunda cadena de ADN (recordemos que los AAV son virus de ADN de cadena simple)[8]. Además, son esenciales para el empaquetamiento del genoma dentro de la cápside[9]. De hecho, son los únicos elementos imprescindibles en el genoma a la hora de generar un vector basado en virus adenoasociados, ya que los ORF se sustituyen por nuestro gen o genes de interés.

Por tanto, los vectores basados en virus adenoasociados consisten básicamente en dos ITRs que flanquean una región que contiene el gen (o genes) de nuestra elección, también llamado transgen. En los vectores AAV de ADN de cadena simple (ssAAV, del inglés *single-stranded AAV*) esa región en la que podemos introducir nuestro transgen tiene unas 4,4 kb. Existe una nueva generación de vectores que contienen una mutación en uno de los ITRs que actúa como una especie de bisagra y hace que el genoma se doble sobre sí mismo y genere inmediatamente un ADN de cadena doble (scAAV, del inglés *self-complementary AAV*)[10]. Esto facilita la expresión de los genes que contenga el vector porque no hay que sintetizar una segunda cadena de ADN. Sin embargo, esta característica también reduce a la mitad la capacidad de empaquetamiento de estos vectores que queda en sólo 2,2 kb.

Como el genoma solamente contiene los ITRs y nuestro gen de interés, los vectores AAV no se pueden replicar ni integrarse en el genoma del hospedador ya que carecen de Rep y Cap, los ORF que se lo permiten. Esto los hace inherentemente seguros como vehículos de terapia génica. Estos ORF sí que son necesarios durante la producción de vectores en células empaquetadoras

(generalmente HEK293T), por lo que se proporcionan de manera externa tanto Rep (proteínas no estructurales) y Cap (proteínas de la cápside), como los genes de los virus *helper* (Adenovirus o Herpex simplex) necesarios para completar el ciclo de replicación del AAV (ver Figura 2).

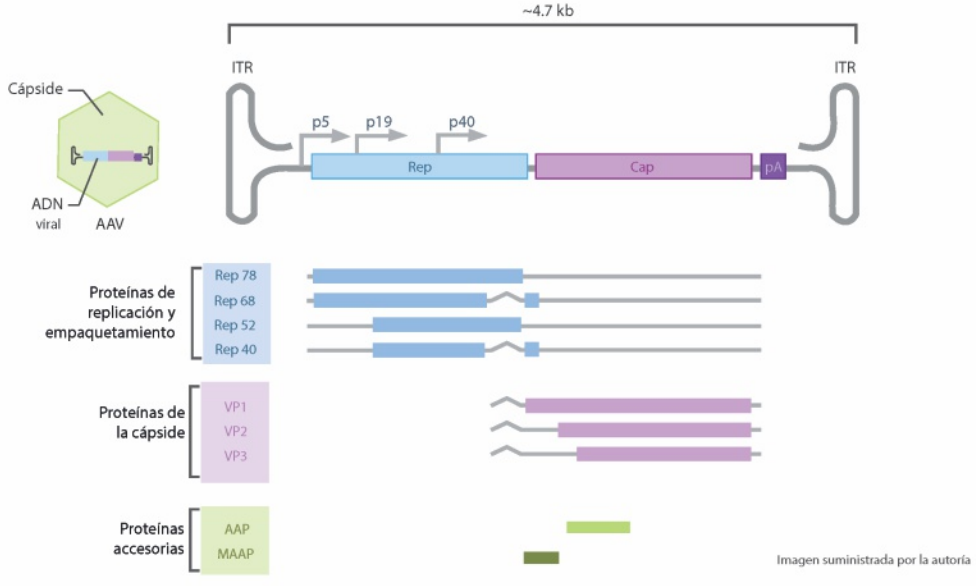


Figura 1.- Estructura del genoma de los virus adenoasociados (AAV). El genoma de los AAV es de ADN de cadena sencilla y tiene 4,7 kb. Consiste en dos ITRs en forma de horquilla que flanquean tres ORF. El primer ORF (Rep) codifica para varias proteínas con funciones relacionadas con la replicación del genoma y su empaquetamiento en la cápside. El segundo ORF (Cap) codifica para las tres proteínas de la cápside: VP1, VP2 y VP3. Estas proteínas conforman la cápside icosaédrica que contiene el ADN viral (imagen de arriba a la izquierda). El último ORF, descubierto recientemente, codifica para las proteínas accesorias AAP y MAAP.

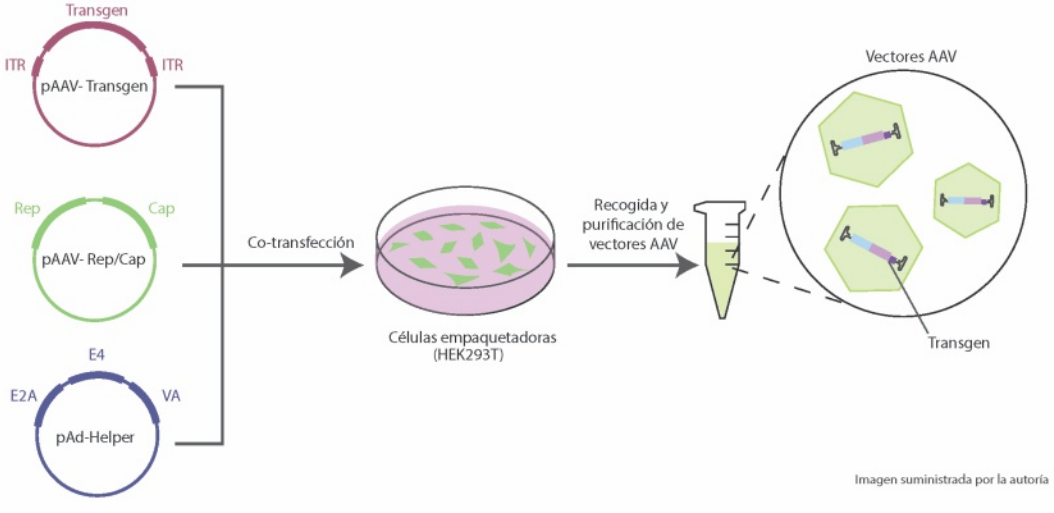


Figura 2.- Producción de vectores AAV. Los vectores adenoasociados se producen en unas células empaquetadoras (generalmente HEK293T). Para ello hay que realizar una transfección con tres plásmidos diferentes: el primero contiene el genoma viral (ITRs + transgen), el segundo contiene los ORF Rep y Cap (que codifican para proteínas estructurales y no estructurales del virus) y el tercero contiene ciertas proteínas del virus helper, en este caso adenovirus (Ad), necesarias para completar el ciclo de replicación del AAV. Al cabo de unos días de realizar la transfección, los vectores AAV se recogen de las células y se purifican para su uso en cultivos celulares, animales de laboratorio o pacientes humanos.

LA AMPLIA VARIEDAD DE CÁPSIDES DE LOS AAV

Una de las grandes ventajas que presentan los vectores AAV es la gran variedad de cápsides con diferentes tropismos y eficiencias tanto *in vitro* como in vivo. Existen tanto variantes naturales[11] como variantes sintéticas derivadas de la introducción de péptidos[12] o mutaciones[13], o de una técnica denominada DNA *family shuffling*[14] que consiste en "barajar" genes similares para mezclar las secuencias y proporcionar más variabilidad genética (ver Figura 3).

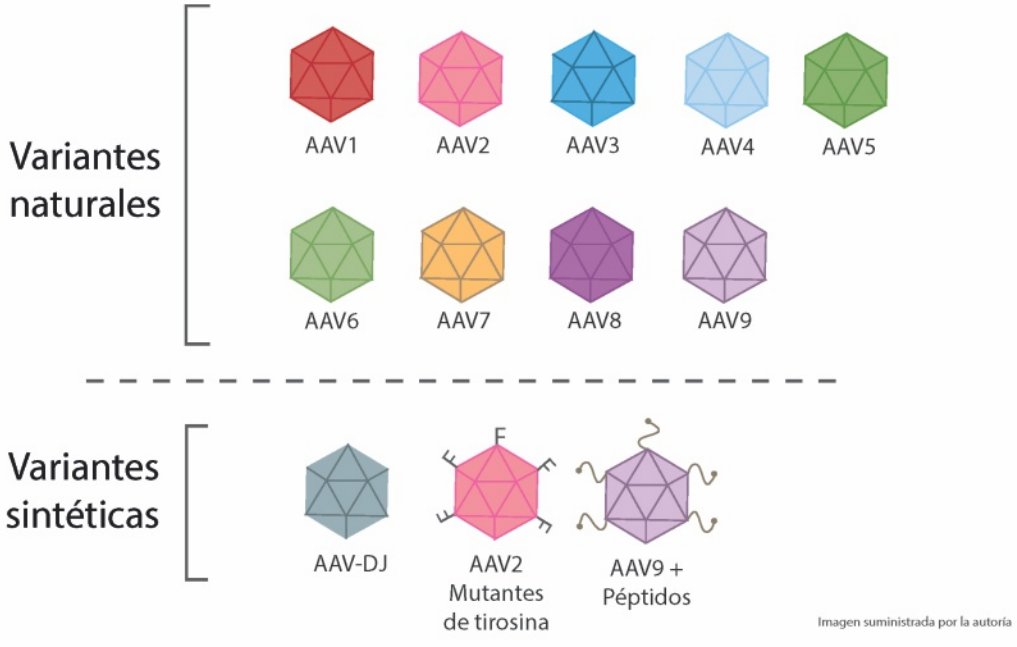


Figura 3.- Variedad de cápsides de AAV. Una de las grandes ventajas de los vectores AAV es la gran variedad de cápsides que existen. En la figura se muestran algunas variantes naturales (parte superior) y algunos ejemplos de variantes sintéticas (parte inferior). Entre los ejemplos de variantes sintéticas se han representado cápsides derivadas de una técnica denominada DNA *family shuffling* (AAV-DJ, izquierda), de mutaciones (AAV2 Mutantes de tirosina, centro) y de la introducción de péptidos (AAV9 + Péptidos, derecha).

La cápside del AAV serotipo 2 (AAV 2) es la variante natural prototípica que más se ha utilizado tanto *in vivo* como *in vitro* durante más de 3 décadas. Sin embargo, otras variantes la superan tanto en eficiencia y tropismo como en escape del sistema inmunitario. Por ejemplo, el AAV serotipo 8 infecta el hígado (y otros órganos como el músculo, el páncreas, y el cerebro) in vivo de manera mucho más eficiente que el AAV 2[15]. Otro ejemplo es AAV DJ, una cápside quimérica compuesta por los serotipos naturales AAV 2, 8, y 9 generada mediante la técnica de AAV *family shuffling*[14]. AAV DJ supera a AAV 2 en muchos tipos celulares tanto *in vitro*, como *in vivo* y, además, es capaz de escapar mejor del efecto de los anticuerpos neutralizantes.

Otra estrategia para evitar las limitaciones del AAV 2 es la mutagénesis racional. Una de estas limitaciones es que el AAV 2 tiene problemas para entrar en el núcleo de las células debido a la señalización a través del receptor del factor de crecimiento epidérmico tirosina quinasa (EGFR-PTK, del inglés *epidermal growth factor receptor protein tyrosine kinase*)[16]. EGFR-PTK fosforila las tirosinas de la cápside de AAV 2 lo que lleva a un aubiquitinización parcial y a la degradación del vector por parte del proteasoma. Para evitar esto, los autores de este descubrimiento razonaron que mutando estas tirosinas podrían evitar la degradación de la cápside y, por tanto, facilitar la entrada al núcleo y mejorar la expresión del material genético del vector. Y, efectivamente, mutando las tirosinas a fenilalaninas consiguieron mejorar la infección de células HeLa *in vitro* y hepatocitos murinos *in vivo*[13].

Por último, otra modificación relevante de los AAV es introducir péptidos en zonas expuestas de la cápside que alteren su tropismo original y/o mejoren su eficiencia de infección.

Un ejemplo de esta estrategia se encuentra en un artículo reciente que explora de manera sistemática la capacidad de 13 cápsides naturales para tolerar la inserción de 27 péptidos diferentes en su superficie[17]. En concreto, la introducción de uno de los péptidos en la cápside del serotipo natural AAV 9 hizo que mejorara su eficiencia y su especificidad infectando células musculares, incluyendo músculo esquelético, cardiaco, y el diafragma[18]. Esta nueva variante de AAV 9 con un péptido insertado en su superficie, llamada AAVMYO, tiene un gran potencial como vector de terapia génica muscular.

APLICACIONES DE LOS VECTORES AAV EN ANIMALES DE LABORATORIO

Los vectores AAV tienen múltiples aplicaciones en animales de laboratorio. De hecho, se pueden utilizar en cualquier aplicación en la que se requiera la expresión transitoria de un gen. Además, con la correcta combinación de cápsides[18] y promotores específicos de tejido[19] se puede restringir la expresión del gen de interés a un órgano, tejido, o incluso un tipo celular concreto. Hay varias aplicaciones en las que el uso de vectores AAV en animales de laboratorio es particularmente interesante: la expresión de la recombinasa Cre en modelos genéticos condicionales, la reprogramación de células somáticas a células pluripotentes *in vivo*, y la utilización del sistema CRISPR/Cas9 de edición genética.

Una de las aplicaciones más comunes de los vectores AAV en animales de laboratorio es la expresión de la recombinasa Cre en modelos genéticos condicionales basados en el sistema Cre-loxP. La recombinasa Cre (abreviación en inglés de *cyclization recombinase*), descubierta en el bacteriófago P1, es capaz de reconocer y unirse a unas secuencias específicas de ADN llamadas loxP (del inglés, *locus of crossing over, x, P1*) y mediar la reestructuración de la secuencia de ADN que se encuentre entre dos de ellas[20]. Las dos secuencias loxP pueden estar localizadas en el mismo fragmento de ADN o en fragmentos separados y, según su orientación y localización, hay tres posibles resultados del proceso de recombinación del gen que se encuentre entre ellas: deleción (mismo fragmento, misma orientación), inversión (mismo fragmento, distinta orientación) o translocación (distinto fragmento)[21]. En este sistema, los vectores AAV se utilizan como vehículos para introducir la recombinasa Cre en tejidos específicos. Por ejemplo, en un estudio publicado en 2018 en el que se utilizaron vectores AAV para reprogramar células somáticas in vivo y del que hablaremos en detalle más adelante, se utilizó el sistema Cre-loxP para determinar el origen de las células reprogramadas[22]. En este caso, se utilizó el modelo genético LSL (loxP-Stop-loxP)-LacZy se inyectó un vector AAV 8 que expresaba la recombinasa Cre bajo el control de un promotor específico de hígado (promotor de la transtirretina, TTR). Con este sistema, se pudo demostrar que las células reprogramadas tenían origen hepático.

De hecho, la segunda gran aplicación de los vectores AAV en animales de laboratorio es la reprogramación de células somáticas. En el año 2007, el investigador japonés Shinya Yamanaka publicó un artículo seminal en el que demostraba que era posible convertir células somáticas en cultivo en células madre pluripotentes inducidas (iPSC, del inglés *induced pluripotent stem cells*) con un *cocktail* de factores de transcripción (Oct-3/4 (O), Sox2 (S), Klf4 (K) y c-Myc (M))[23]. Su método de reprogramación in vitro le supuso el premio Nobel de Fisiología y Medicina en 2012 y, hoy en día, se ha convertido en una técnica de rutina en muchos laboratorios. La aplicación de esta tecnología *in vivo* tiene un gran potencial ya que, por un lado, permite diseccionar los mecanismos que regulan la reprogramación o desdiferenciación de células tanto en organismos sanos como en organismos con patologías (como, por ejemplo, el cáncer) y, por otro, permite desarrollar estrategias clínicamente relevantes en medicina regenerativa. La primera aproximación a la reprogramación *in vivo* se realizó en 2012 utilizando ratones transgénicos[24]. Aunque esta estrategia fue pionera y permitió avanzar en el estudio de la desdiferenciación *in vivo*, no tenía la suficiente versatilidad como para aplicarla en la regeneración de tejidos humanos. Los vectores AAV, debido a su gran variedad de cápsides, son herramientas ideales para expresar los factores de reprogramación (OSKM) *in vivo* en órganos, tejidos, o incluso células específicas. Además, como se ha comentado anteriormente, los AAV no son patogénicos en humanos y no pueden replicarse en ausencia de un virus *helper* (Adenovirus o Herpex Virus) lo que los convierte en vectores seguros para aplicaciones de medicina regenerativa. En 2018 se publicó un método que permitía reprogramar eficientemente células somáticas de ratones adultos por inyección intravenosa de vectores AAV 8 que codificaban los factores de reprogramación OSKM [22,25]. Los ratones inyectados con los vectores AAV 8-OSKM presentaban teratomas (masas procedentes del crecimiento y diferenciación descontrolada de células pluripotentes) tanto en el hígado (órgano al que tiene tropismo preferencial AAV 8) como en otros órganos, además de iPSC circulando por el torrente sanguíneo. Además de en esta prueba de concepto, el método de reprogramación *in vivo* utilizando vectores AAV (en concreto, AAV 2 codificando OSK) ha sido recientemente utilizado para regenerar el sistema nervioso central en ratones y restaurarles la visión[26], confirmando su potencial en estrategias de medicina regenerativa.

La otra gran aplicación de los vectores AAV en animales de laboratorio es la expresión del sistema CRISPR/Cas9 *in vivo*. CRISPR/Cas es el sistema equivalente a nuestro sistema inmune adaptativo que tienen las bacterias y las arqueas para defenderse contra virus y plásmido foráneos[27]. A principios de la pasada década, Charpentier y Doudna idearon una forma de convertir este "sistema inmunitario" de bacterias en un método de edición genética que se pudiera utilizar en otros organismos[28]. Para ello, estudiaron cuáles eran los componentes mínimos de este sistema necesarios para generar cortes precisos en el genoma eucariota y descubrieron que eran solamente dos: la proteína Cas9 y un ARN guía (gRNA, del inglés *guide* RNA). Este método es relativamente sencillo de utilizar lo que supuso una revolución en el campo de la ingeniería genética ya que abría infinitas posibilidades. El descubrimiento fue tan relevante que implicó que estas dos investigadoras obtuvieran el premio Nobel de Química en 2020. Tan sólo 2 años después de la publicación del artículo seminal de Charpentier y Doudna, se empaquetó por primera vez el sistema CRISPR/Cas9 en vectores AAV[29]. Un factor limitante a la hora de expresar este sistema en vectores AAV son las restricciones en el tamaño del genoma (4,4 kb en el caso de los ssAAV y 2,2 kb en el caso de los scAAV) dado que la proteína Cas9 tiene aproximadamente 4,1 kb. Sin embargo, utilizando promotores mínimos es posible introducir los dos componentes en un sólo vector[29], lo que aumenta las posibilidades de éxito de la edición genética de precisión in vivo. Desde la publicación de este artículo en 2014, el uso de vectores AAV para la expresión *in vivo* del sistema CRISPR/Cas9 se ha demostrado en numerosos modelos animales de diferentes enfermedades y en animales no modificados[30]. Además de estos estudios de prueba de concepto en animales de laboratorio, el primer ensayo clínico en humanos ya está en marcha. En este ensayo clínico, que está en fase 1/2, se está inyectando un vector AAV-CRISPR directamente en el ojo de los pacientes para corregir una mutación en el gen *CEP290* que provoca ceguera (clinicaltrials.gov; identificador: NCT03872479).

CONCLUSIONES

Los vectores AAV son unas herramientas muy versátiles para expresar cualquier tipo de gen *in vivo*. Su amplia variedad de cápsides (tanto naturales como sintéticas) permite introducir genes en órganos, tejidos, o incluso células específicas. Además, estos vectores no se pueden replicar ni integrar en el genoma del hospedador sin la presencia de sus virus *helper* (Adenovirus y Herpex Simplex), lo que los hace muy seguros tanto para los animales de laboratorio como para los humanos. Debido a estas características, han sido ampliamente utilizados en terapia génica, habiendo ya fármacos basados en vectores AAV en ensayos clínicos o incluso aprobados en el mercado. Para los animales de laboratorio tienen infinidad de aplicaciones: todas aquellas en las que se requiera expresar un gen de forma transitoria en un órgano o tejido específico. Las más relevantes comentadas en detalle en este artículo son la expresión de la recombinasa Cre en modelos genéticos condicionales, la reprogramación de células somáticas a células madre pluripotentes inducidas, y la aplicación del sistema CRISPR/Cas9. La primera porque ha sido una de las aplicaciones más utilizadas hasta la fecha en animales de laboratorio. La segunda porque permite estudiar los mecanismos de desdiferenciación y ensayar en animales posibles nuevas estrategias en medicina regenerativa. Y la tercera porque permite editar genes directamente en los tejidos u órganos que lo requieran. En conclusión, los vectores AAV abren una plétora de posibilidades en la investigación con animales de laboratorio sólo limitada por los confines de nuestra imaginación.

GLOSARIO

- **Cápside:** cubierta proteica de un virus, en cuyo interior se encuentra su material genético.
- **Diferenciación/desdiferenciación:** proceso por el cual las células pluripotentes van madurando y adquiriendo una especialización cada vez más restringida (o al contrario en el caso de la desdiferenciación).
- **Pluripotente:** célula con la capacidad de convertirse en cualquier célula del embrión.
- **Transfección:** introducción de ADN exógeno al interior de una célula eucariota.
- **Tropismo:** afinidad que presenta un virus determinado con uno o más tejidos de su hospedador.
- **Vector viral:** virus modificado que hace de vehículo para introducir material genético exógeno en el núcleo de una célula.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wang D, Tai PWL, and Gao G. *Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery*. Nature Reviews Drug Discovery. 2019;18:358-378.

2. Srivastava A. *In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors.* Current Opinion in Virology . 2016;21:75-80.

3. Colella P, Ronzitti G, and Mingozzi F. *Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy.* Molecular Therapy - Methods and Clinical Development. 2018;8:87-104.

4. Geoffroy MC and Salvetti A. *Helper functions required for wild type and recombinant adeno-associated virus growth.* Curr. Gene Ther. 2005;5:265-271.

5. Srivastava A, Lusby EW, and Berns KI. *Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome.* J. Virol. 1983;45:555-564.

6. Sonntag F, Kóther K, Schmidt K, *et al. The assembly-activating protein promotes capsid assembly of different adeno-associated virus serotypes.* J. Virol. 2011;85:12686-12697.

7. Elmore ZC, Havlik LP, Oh DK, *et al. The membrane associated accessory protein is an adeno-associated viral egress factor.* Nat. Commun. 2021;12:6239.

8. Hauswirth WW and Berns KI. *Adeno-associated virus DNA replication: nonunit-length molecules.* Virology. 1979;93:57-68.

9. Zhou X and Muzyczka N. *In vitro packaging of adeno-associated virus DNA.* J. Virol. 1998;72:3241-3247.

10. McCarty DM. *Self-complementary AAV vectors; advances and applications.* Mol. Ther. 2008;16:1648-1656.

11. Grimm D and Kay MA. *From virus evolution to vector revolution: use of naturally occurring serotypes of adeno-associated virus (AAV) as novel vectors for human gene therapy.* Curr. Gene Ther. 2003;3:281-304.

12. Müller OJ, Kaul MA, Weitzman MD, *et al. Random peptide libraries displayed on adeno-associated virus to select for targeted gene therapy vectors.* Nat. Biotechnol. 2003;21:1040-1046.

13. Zhong L, Li B, Mah CS, *et al. Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2008;105:7827-7832.

14. Grimm D, Lee JS, Wang L, *et al. In vitro and in vivo gene therapy vector evolution via multispecies interbreeding and retargeting of adeno-associated viruses.* J. Virol. 2008;82:5887-5911.

15. Nakai H, Fuess S, Storm TA, *et al. Unrestricted Hepatocyte Transduction with Adeno-Associated Virus Serotype 8 Vectors in Mice.* J. Virol. 2005;79(1).

16. Zhong L, Li B, Jayandharan G, *et al. Tyrosine-phosphorylation of AAV2 vectors and its consequences on viral intracellular trafficking and transgene expression.* Virology . 2008;381:194-202.

17. Börner K, Kienle K, Huang LY, *et al. Pre-arrayed Pan-AAV Peptide Display Libraries for Rapid Single-Round Screening.* Mol. Ther. 2020;28:1016-1032.

18. Weinmann J and Grimm D. *Next-generation AAV vectors for clinical use: an ever-accelerating race.* Virus Genes. 2017;53:707-713.

19. Zheng C and Baum BJ. *Evaluation of promoters for use in tissue-specific gene delivery.* Methods Mol. Biol. 2008;434:205-219.

20. Sternberg N and Hamilton D. *Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites.* J. Mol. Biol. 1981:150;467-486.

21. McLellan MA, Rosenthal NA, and Pinto AR. *Cre-loxP-Mediated Recombination: General Principles and Experimental Considerations.* Curr. Protoc. Mouse Biol. 2017;7:1-12.

22. Senís E, Mosteiro L, Wilkening S, *et al. AAVvector-mediated in vivo reprogramming into pluripotency.* Nat. Commun. 2018;9:2651.

23. Takahashi K and Yamanaka S. *Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors.* Cell. 2006;126(4):663-676.

24. Abad M, Mosteiro L, Pantoja C, *et al. Reprogramming in vivo produces teratomas and iPS cells with totipotency features.* Nature. 2013;502:340-345.

25. Senís E, Mosteiro L, Grimm D, *et al. A Versatile In Vivo System to Study Myc in Cell Reprogramming.* Methods Mol. Biol. 2021;2318:267-279.

26. Lu Y, Brommer B, Tian X, *et al. Reprogramming to recover youthful epigenetic information and restore vision.* Nature. 2020;588:124-129.

27. Mojica FJM and Rodriguez-Valera F. *The discovery of CRISPR in archaea and bacteria.* FEBS J. 2016;283:3162-3169.

28. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, *et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity.* Science. 2012;337:816-821.

29. Senís E, Faoutors C, Grobe S, *et al. CRISPR/Cas9-mediated genome engineering: An adeno-associated viral (AAV) vector toolbox.* Biotechnol. J. 2014;9(11):1402-1412.

30. Lau C-H and Suh Y. *In vivo genome editing in animals using AAV-CRISPR system: applications to translational research of human disease. F1000 Research.* 2017;6:2153.

ANIMALES DE LABORATORIO
VERANO 2022 / NÚMERO 94

Una encuesta sobre el uso de ratones, cerdos, perros y monos como modelos animales en la investigación biomédica

Iván Ortega Saez[1], Olatz Goñi Balentziaga[2], Sergi Vila Bellmunt[1], y Garikoitz Azkona Mendoza[2]
[1]*Universitat de Barcelona (UB)*
[2]*EuskalHerrikoUnibertsitatea (UPV/EHU)*

Palabras clave: animal de laboratorio, estatus moral, escala filogenética.

INTRODUCCIÓN

El objetivo de la investigación biomédica es mejorar la salud humana; sin embargo, el uso de seres humanos en experimentos de investigación se considera generalmente inaceptable desde un punto de vista moral. Además, las normas éticas internacionales establecen que la investigación médica con seres humanos debe basarse en resultados previos obtenidos en la experimentación con animales[1].

En 2013, España incorporó a su marco legislativo la Directiva 2010/63/UE (trasposición en el RD 53/2013); con lo que la legislación española para la protección de los animales utilizados con fines científicos, está basada en el remplazo, la reducción y el refinamiento (las 3Rs). Estos principios promueven el remplazar la experimentación animal por alternativas no sensibles, reducir el número de animales empleados en los procedimientos y refinar las técnicas experimentales y las condiciones de cría para causar el mínimo dolor y angustia[2]. Esto constituye un avance teórico en el fortalecimiento de la posición general sobre el bienestar animal.

En la actualidad, los científicos están trabajando para producir datos válidos sobre cómo medir el bienestar en todas las especies de animales de laboratorio. Para ello, piden más recursos públicos y equipos interdisciplinares para resolver el dilema de cómo lograr un equilibrio entre la legislación sobre bienestar animal y la libertad científica[3]. Del mismo modo, el Eurogrupo por el Bienestar Animal centra sus esfuerzos en la aplicación de métodos de reducción y refinamiento en investigación[4].

La opinión pública sobre el uso de animales de laboratorio se ve influenciada por un sinfín de factores biológicos y socioculturales[5]. Por ejemplo, las actitudes hacia el uso de animales por parte de los seres humanos pueden verse afectadas por su experiencia previa (o actual) con los animales[6,7], así como el país europeo en el que vivas o la especie animal. Según el Eurobarómetro especial realizado en 2010[8], dos de cada tres (66%) ciudadanos europeos consideraban que la experimentación con ratones era aceptable si con ello se conseguía mejorar la salud y el bienestar humano. Sin embargo, sólo el 44% estaba de acuerdo (frente al 37% que estaba en desacuerdo) con el uso de perros o monos para el mismo fin. En este sentido, el 75% de los ciudadanos españoles consideraba aceptable el uso de ratones en la ciencia, y el 65% aprobaba el uso de perros y monos. Un estudio más reciente reveló que los españoles estaban más preocupados por el bienestar de los animales de laboratorio que sus homólogos de Rumanía, Lituania, Polonia y Suecia[9]; y recientemente hemos observado que las personas que trabajan con roedores de laboratorio en nuestro país están muy concienciadas y son muy sensibles a su bienestar[10].

En 2015, una Iniciativa Ciudadana Europea (ICE) *Stop Vivisection* reunió 1,17 millones de firmas, pidiendo la eliminación progresiva de todos los experimentos con animales para fines científicos[11]. Aunque la legislación europea actual establece que el objetivo general es sustituir por completo todos los procedimientos que utilizan animales vivos para fines científicos y educativos -tan pronto como sea científicamente posible-, todavía estamos muy lejos de lograr este objetivo. Según un informe publicado por el Comité Nacional de los Países Bajos para la Protección de los Animales Utilizados con Fines Científicos (NCad), en lo que respecta a las pruebas de seguridad reglamentarias, los ensayos con animales podrían eliminarse progresivamente para 2025[12]. Sin embargo, Suiza acaba de rechazar la prohibición de los ensayos con animales por referéndum[13].

El uso de animales en la investigación biomédica sigue siendo controvertido. Por un lado, se considera que los modelos animales son necesarios para comprender mejor la fisiopatología de algunas enfermedades humanas, ya que ciertos fenómenos sólo pueden estudiarse *in vivo*[14]. Además, la Agencia Europea del Medicamento (EMA) sigue considerando que los estudios preclínicos en animales son fundamentales para el proceso de aprobación de productos médicos, por lo que es poco probable que permita a ningún científico embarcarse en un ensayo clínico sin alguna prueba *in vivo* de seguridad y eficacia. En el otro lado del argumento, el menor grado de similitud entre los animales y los humanos, pone en duda la legitimidad de experimentar con (algunos) animales[14]. A este respecto, se han identificado tres amplias posturas en la sociedad: (1) aquellos que creen que los seres humanos tienen una importancia moral de la que carecen otros animales; (2) los que opinan que existe una escala moral en la que los seres humanos están en la cima; y (3) aquellos que creen que los seres humanos y los animales son iguales moralmente[15].

En este estudio queremos analizar la opinión de: (a) las personas que nunca han trabajado, y (b) las que ya no trabajaban con animales de laboratorio sobre el uso de ratones, cerdos, perros y monos en la investigación biomédica. También queremos determinar hasta qué grado (c) las personas que participaban en la investigación biomédica con las especies mencionadas, creen justificado su trabajo.

MÉTODOS

Participantes y procedimiento

Los participantes que nunca habían trabajado (a) y los que ya no trabajaban (b) con animales de laboratorio fueron reclutados por *WhatsApp* o correo electrónico entre el 3 de enero de 2022 y el 3 de marzo de 2022. Los participantes que actualmente trabajan (c) con animales de laboratorio fueron reclutados por correo electrónico a través de la lista de la Sociedad Española para la Ciencia del Animal de Laboratorio (SECAL-L) entre el 1 de diciembre de 2020 y el 31 de mayo de 2021. El estudio se restringió a personas mayores de 20 años residentes en España.

En una carta de presentación adjunta al cuestionario, se informó a los participantes de que los datos de la encuesta se utilizarían con fines científicos y que permanecerían anónimos. Todos los participantes dieron su consentimiento informado voluntario antes de rellenar un breve cuestionario online de 5 minutos (plataforma *Google Drive*). El estudio se realizó de acuerdo con las directrices establecidas por la Declaración de Helsinki. Todos los procedimientos y protocolos de consentimiento informado fueron aprobados por el Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos (CEISH) de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU); M10/2020/222, M10/2021/136 y M10/2021/365.

Cuestionario

El cuestionario recogía información personal de los participantes, incluyendo género, rango de edad y educación. A los participantes que habían trabajado anteriormente con animales de laboratorio (b), también se les preguntó sobre su anterior institución, categoría laboral, años y horas/semana dedicados a trabajar con animales de laboratorio, y su(s) razón(es) para dejar de trabajar con ellos: alergias, cambio de proyecto de investigación, cambio de carrera profesional, salario, cuestiones éticas, empatía hacia los animales u horas de trabajo; también se proporcionó espacio para que escribieran una respuesta más detallada. A los participantes que actualmente trabajan con animales de laboratorio (c) se les preguntó por su institución actual, categoría laboral, años de trabajo con animales de laboratorio y horas a la semana trabajadas.

A continuación, se pidió a aquellos que nunca habían trabajado (a) y a los que habían trabajado anteriormente con animales de laboratorio (b) que respondieran a la siguiente afirmación: "Creo que debería permitirse que los científicos investiguen en animales como (ratones/cerdos/perros/monos) si esto puede ayudar a resolver problemas de salud humana"; *totalmente de acuerdo, de acuerdo, ni de acuerdo ni en desacuerdo, en desacuerdo, totalmente en desacuerdo o no sabe*[8]. A los participantes que actualmente trabajan con ratones, cerdos, perros o monos (c) se les pidió que respondieran a la afirmación "En los últimos 30 días, ¿con qué frecuencia ha pensado que su trabajo con animales de laboratorio está justificado?"; *nunca, rara vez, a veces, a menudo o muy a menudo*. También se preguntó con qué frecuencia hablaban con personas ajenas a su círculo social inmediato sobre su trabajo con animales de laboratorio; *nunca, a veces, la mitad de las veces, la mayoría de las veces o siempre.*

Análisis de datos estadísticos

Todos los análisis estadísticos se realizaron con los paquetes de software Jamovi (1.16.15) y SPSS (Statistics 24). Para describir la muestra se utilizaron estadísticas de frecuencia (%)

y de distribución media ± desviación estándar (DE). La consistencia de las opiniones entre especies se analizó mediante la correlación de Spearman; ≤ 0,3 (efecto débil), 0,3 - ≤ 0,5 (efecto moderado), 0,5 - ≤ 0,7 (efecto fuerte) y > 0,7 (efecto muy fuerte). Se realizaron pruebas de Chi-cuadrado para analizar las asociaciones entre las opiniones y otras variables (sexo, edad y educación) y, si los resultados eran significativos, se calcularon los residuos ajustados. Se utilizó la V de Cramer para calcular el tamaño del efecto; ≤ 0,2 (efecto débil), 0,2 - ≤ 0,4 (efecto moderado), 0,4 - ≤ 0,6 (efecto relativamente fuerte) y > 0,6 (efecto fuerte). El nivel de significación se fijó en $p < 0,05$.

MÉTODOS

Participantes y procedimiento

Un total de 807 individuos participaron en la encuesta, siendo casi dos tercios mujeres. La información personal correspondiente a cada grupo de participantes se resume en la Tabla 1.

Tabla 1.- Información demográfica de los participantes.

	Nunca he trabajado	Trabajé	Trabajo	Total
	n (%)			
Género				
Mujer cis/trans	169 (59,3%)	31 (55,4%)	316 (67,8%)	**516 (63,9%)**
Hombre cis/trans	104 (36,5%)	24 (42,9%)	138 (29,6%)	**266 (33,0%)**
No-binario	2 (0,7%)	-	-	**2 (0,2%)**
Prefiero no decir	10 (3,5%)	1 (1,8%)	12 (2,6%)	**23 (2,9%)**
Rango de edad				
20-29	77 (27,0%)	8 (14,3%)	132 (28,3%)	**217 (26,9%)**
30-39	72 (25,3%)	21 (37,5%)	137 (29,4%)	**230 (28,5%)**
40-49	83 (29,1%)	18 (32,1%)	126 (27%)	**227 (28,1%)**
50-59	39 (13,7%)	8 (14,3%)	60 (12,9%)	**107 (13,3%)**
≥ 60	14 (4,9%)	1 (1,8%)	11 (2,4%)	**26 (3,2%)**
Educación				
Primaria	5 (1,8%)	-	3 (0,6%)	**8 (1%)**
Secundaria	14 (4,9%)	1 (1,8%)	18 (3,9%)	**33 (4,1%)**
Formación profesional	41 (14,4%)	8 (14,3%)	71 (15,2%)	**120 (14,9%)**
Licenciatura	190 (66,7%)	20 (35,7%)	199 (42,7%)	**409 (50,7%)**
Doctorado	35 (12,3%)	27 (48,2%)	175 (37,5%)	**237 (29,4%)**
Total (n)	**285**	**56**	**466**	**807**

Imagen suministrada por la autoría

Dentro del grupo de participantes que solían trabajar con animales, la mayoría eran investigadores que habían trabajado con ellos durante su doctorado, y menos de una quinta parte trabajó como personal de animalario. Por término medio, habían trabajado durante 5,5 ± 6,5 años con animales de laboratorio, y pasaban 17,2 ± 14,5 horas a la semana con ellos, siendo centros de investigación o universidades en lugar de trabajo para 8 de cada 10 encuestados (ver Tabla 2). La mayoría (51/91,1%) había trabajado con roedores (ratones, ratas, cobayas), 8 (14,3%) con especies acuáticas, 5 (8,9%) con pequeños carnívoros (perros, gatos, hurones) o animales de granja (cerdos, vacas, ovejas) y un participante (1,8%) había trabajado con primates no humanos. Casi la mitad afirmó haber dejado de trabajar con animales por un cambio en su carrera profesional, aunque la empatía hacia los animales, el salario y el cambio de proyecto de investigación también fueron razones aducidas (ver Tabla 3).

Tabla 2.- Información profesional de los participantes.

	Trabajé	**Trabajo**	**Total**
	n (%)		
Categoría profesional			
Asesor en bienestar y/o veterinario	1 (1,8%)	62 (13,3%)	**63 (12,1%)**
Cuidador o técnico	9 (16,1%)	95 (20,4%)	**104 (19,9%)**
Investigador	15 (26,8%)	153 (32,8%)	**168 (32,2%)**
Técnico de investigación	8 (14,3%)	67 (14,4%)	**75 (14,4%)**
Estudiante de doctorado	23 (41,1%)	89 (19,1%)	**112 (21,5%)**
Institución			
Universidad	22 (39,3%)	133 (28,5%)	**155 (29,7%)**
Centro investigación	31 (55,4%)	232 (49,8%)	**263 (50,4%)**
Hospital	2 (3,6%)	42 (9%)	**44 (8,4%)**
Organización investigación bajo contrato	-	40 (8,6%)	**40 (7,7%)**
Farmacéutica	-	10 (2,1%)	**10 (1,9%)**
Otro tipo de empresa privada	1 (1,8%)	9 (1,9%)	**10 (1,9%)**
Total (n)	**56**	**466**	

Imagen suministrada por la autoría

Tabla 3.- Razones por las que dejaron de trabajar con animales de laboratorio.

	Categoría de trabajo					
	Asesor en bienestar y/o veterinario	Cuidador o técnico	Investigador	Técnico de investigación	Estudiante de doctorado	**Total**
Razón	**n (%)**					**n (%)**
Cambio vida profesional	1 (100%)	7 (43,8%)	8 (47,1%)	4 (50%)	16 (50%)	36 (48,6%)
Cambio proyecto de investigación	-	-	6 (35,3%)	3 (37,5%)	4 (12,5%)	13 (17,6%)
Empatía	-	2 (12,5%)	1 (5,9%)	-	6 (18,8%)	9 (12,2%)
Salario	-	5 (31,3%)	1 (5,9%)	-	1 (3,1%)	7 (9,5%)
Problemas éticos	-	2 (12,5%)	-	-	3 (9,4%)	5 (6,8%)
Horas de trabajo	-	-	-	1 (12,5%)	1 (3,1%)	2 (2,7%)
Alergias	-	-	-	-	1 (3,1%)	1 (1,4%)
Aumento de los obstáculos impuestos por la administración	-	-	1 (5,9%)	-	-	1 (1,4%)

Imagen suministrada por la autoría

Más de la mitad de los que trabajaban actualmente con animales eran investigadores (309/66,3%), y el resto trabajaba en animalarios (157/33,7%). Por término medio, afirmaban haber trabajado con animales durante 11,5 ± 8,8 años, dedicando 16,7 ± 14,6 horas semanales a ellos. Al igual que en el anterior grupo (b), la mayoría trabajaba en centros de investigación o universidades (ver Tabla 2) y la especie más empleada eran los ratones, seguida de cerdos, perros y monos.

Opinión de los Participantes

(a) Nunca han trabajado con animales de laboratorio

De los participantes que nunca han trabajado con animales de laboratorio, más de la mitad estaban de acuerdo o totalmente de acuerdo con realizar investigaciones en ratones, mientras que el 25% estaban en desacuerdo o totalmente en desacuerdo. En relación con la investigación con cerdos, casi la mitad estaba de acuerdo o totalmente de acuerdo, frente a no más del 40% que estaba en desacuerdo o totalmente en desacuerdo. En el caso de los perros y primates, estos porcentajes se invirtieron ya que casi la mitad de los participantes de este grupo estaban en desacuerdo o totalmente en desacuerdo con la realización de investigaciones en perros, y menos del 40% estaban de acuerdo o totalmente de acuerdo (ver Figura 1).

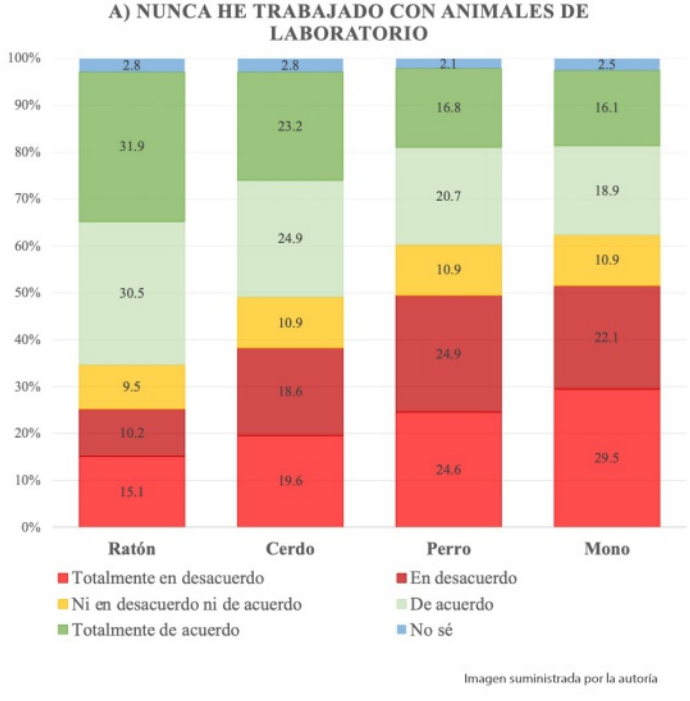


Imagen suministrada por la autoría

Figura 1.- Opiniones de los participantes que nunca han trabajado con animales de laboratorio sobre la investigación realizada con las diferentes especies, en porcentajes.

El análisis de chi-cuadrado reveló diferencias de género. Las mujeres de este grupo estaban más en desacuerdo que sus homólogos masculinos, con la realización de investigaciones en cualquier especie: ratones ($X^2_{(15)} = 32,84$, $p = 0.005$, V de Cramer = 0,20), cerdos ($X^2_{(15)} = 35,75$, $p = 0,002$; V de Cramer = 0,20), perros ($X^2_{(15)} = 47,65$, $p < 0.0001$; V de Cramer = 0,24) y monos ($X^2_{(15)} = 27,49$, $p = 0.025$; V de Cramer = 0,18). No se observaron diferencias en cuanto al rango de edad o la educación.

(b) Solían trabajar con animales de laboratorio

Los participantes que habían dejado de trabajar con animales de laboratorio estaban mayoritariamente de acuerdo o totalmente de acuerdo con el uso de ratones y cerdos con fines de investigación; sin embargo, este porcentaje era menor para las demás especies estudiadas, donde solo alrededor de la mitad de los participantes de este grupo estaban de acuerdo o totalmente de acuerdo con el uso de perros y monos. El porcentaje de los que estaban en desacuerdo o totalmente en desacuerdo con el uso de monos y perros era mayor que en el caso de los cerdos y los ratones (ver Figura 2).

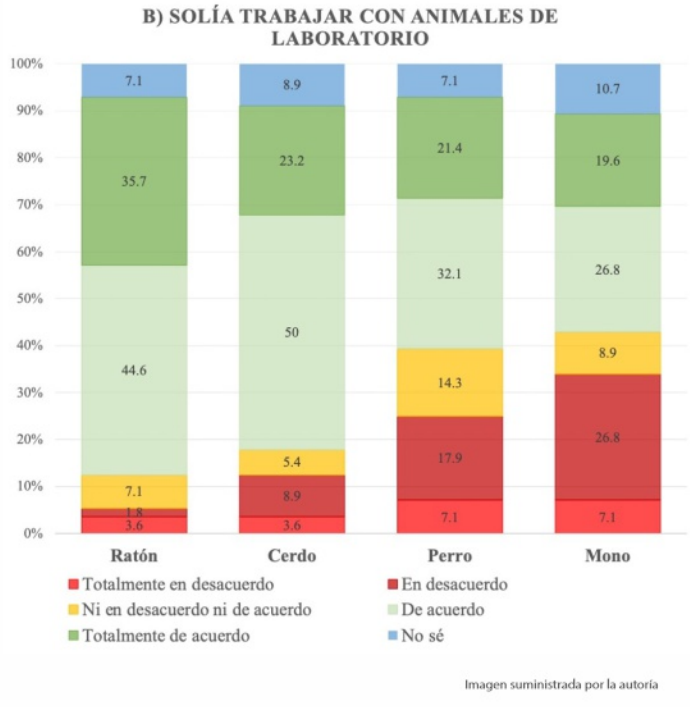


Imagen suministrada por la autoría

Figura 2.- Opiniones de los participantes que solían trabajar con animales de laboratorio sobre la investigación realizada con las diferentes especies, en porcentajes.

El análisis de chi-cuadrado indicó que los hombres que solían trabajar con animales de laboratorio, estaban más en desacuerdo que sus homólogos femeninos con la realización de investigaciones con ratones ($X^2_{(10)} = 22,77$, $p = 0,012$, V de Cramer = 0,45) y cerdos ($X^2_{(10)} = 21,72$, $p = 0,017$; V de Cramer = 0,4), aunque

no se observaron diferencias en relación con la investigación con perros o monos, ni en términos de rango de edad o educación.

(c) Trabajan con animales de laboratorio

La mayoría de los participantes que trabajaban con ratones y cerdos en el momento de realizar la encuesta, consideraban que su trabajo con animales de laboratorio estaba justificado a menudo o muy a menudo, siendo este porcentaje del 100% entre los que trabajaban con perros y monos (ver Figura 3). No se observaron diferencias en cuanto al género, la edad o la educación.

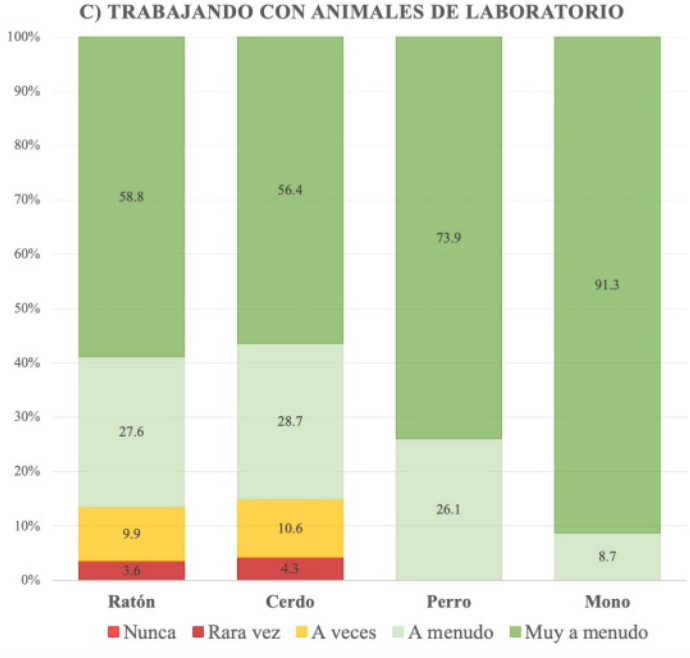


Imagen suministrada por la autoría

Figura 3.- Representación de la frecuencia con la que los participantes pensaban que su trabajo con ratones, cerdos, perros o monos estaba justificado, en porcentajes.

Por último, la prueba de independencia chi-cuadrado reveló una asociación moderada significativa entre la especie y el hecho de hablar con personas ajenas al círculo social inmediato sobre el propio trabajo ($X^2_{(12)} = 61{,}9$, $p < 0{,}001$; V de Cramer = 0,203). Más del 90% de los participantes que trabajaban con perros o monos dijeron que nunca hablaban de su trabajo, mientras que esta cifra era algo inferior al 40% para los que trabajaban con ratones o cerdos (ver Figura 4).

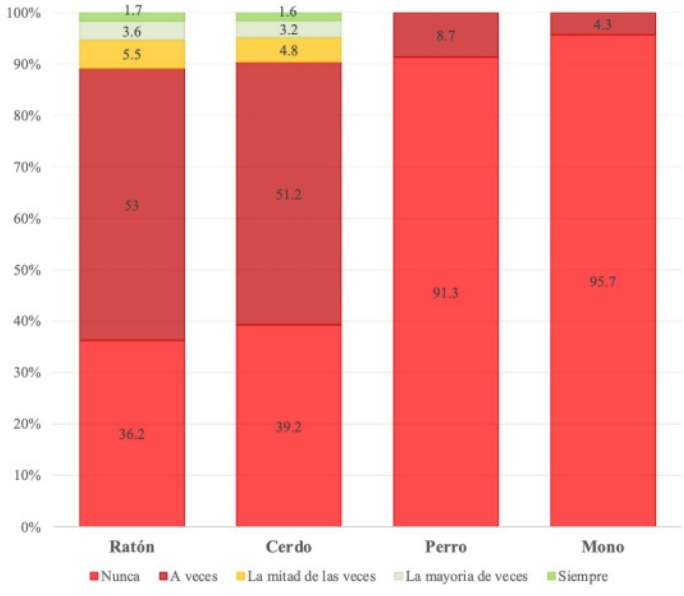


Imagen suministrada por la autoría

Figura 4.- Representación de la frecuencia con la que los participantes hablan de su trabajo con personas ajenas a su círculo social inmediato, en porcentajes.

DISCUSIÓN

La investigación con animales en la ciencia biomédica sigue siendo un tema controvertido. En un estudio anterior, observamos que las personas que trabajaban con roedores de laboratorio eran cautelosas y rara vez hablaban de su trabajo, lo que sugiere que la experimentación con animales es considerado un tema sensible en España[10]. En este estudio, nuestro objetivo era explorar la opinión sobre el uso de ratones, cerdos, perros y monos en la investigación biomédica, en función de si habían trabajado alguna vez con estos animales. Para ello, invitamos a personas que nunca habían trabajado con animales de laboratorio y a personas que dejaron de trabajar con ellos, a responder a las mismas preguntas que se plantearon en el Eurobarómetro de 2010[8]. Para completar el estudio, también invitamos a las personas que trabajaban en ese momento con las especies mencionadas, a que nos dijeran lo frecuente que sentían que su trabajo con animales estaba justificado. Cabe decir, que incluimos a los cerdos en nuestra encuesta porque actualmente se consideran una especie óptima para albergar la formación de órganos humanos quiméricos[16], y porque, según los últimos informes estadísticos sobre el uso de animales con fines científicos en la Unión Europea[17] y España[18], su uso ha aumentado en los últimos años.

Nuestros resultados revelaron que la escala filogenética es un factor importante en la opinión de las personas sobre el uso de determinadas especies con fines de investigación. Entre los que nunca habían trabajado con animales, el número de participantes que estaban en contra del uso de monos y perros era dos veces mayor que el de los que estaban en contra del uso de ratones. Observamos la misma tendencia en el grupo de los que solían trabajar con animales, siendo el porcentaje de los que estaban en contra del uso de perros o monos al menos cinco veces mayor que el de los que estaban en contra del uso de ratones. Además, las opiniones eran mayoritariamente coherentes entre las distintas especies y los participantes que estaban en desacuerdo con el uso de ratones, también lo estaban con el uso de otras especies. Estos resultados apoyan la suposición de que existe una diferencia de estatus moral entre al menos algunos mamíferos de mayor tamaño (por ejemplo, primates no humanos, perros y cerdos) y al menos algunos mamíferos más pequeños (por ejemplo, ratones)[19]. Las diferencias observadas entre el uso de cerdos y el de perros y monos pueden deberse a que, en España, los cerdos se consideran animales de granja. En 2020, España fue el segundo productor de carne de cerdo de Europa y el cuarto del mundo[20]. Además, en un estudio reciente, se observó que los participantes sentían más preocupación moral por los animales de compañía (por ejemplo, los perros) y por los animales salvajes atractivos (por ejemplo, los chimpancés) que por los animales destinados a la alimentación (por ejemplo, los cerdos)[21].

Un dato relevante que observamos en el estudio, fue un efecto de género contradictorio. En el grupo que nunca había trabajado con animales, aquellos participantes que se identificaban como mujeres eran más propensos a oponerse al uso de animales frente a los que se identificaban como hombres. Este hallazgo es coherente con los reportados por estudios previos[7,22]. No obstante, en el grupo de participantes que solían trabajar con animales, se observó el efecto contrario. Lamentablemente, el pequeño tamaño de nuestra muestra impide sugerir una explicación para este hecho.

Trabajar con animales de laboratorio puede aportar satisfacción, pero también puede provocar estrés laboral[23]. No podemos descartar la posibilidad de que éste sea el factor que motive el cambio de profesión que declararon la mayoría de los participantes en nuestro estudio que ya no trabajaban con animales de laboratorio. Lo que sí encontramos en nuestro estudio anterior, es que el *burnout* observado entre los estudiantes de doctorado de biomedicina en España no estaba relacionado únicamente con su trabajo con animales de laboratorio[24]. A nivel nacional, los investigadores son especialmente vulnerables debido a la naturaleza inestable de las carreras científicas y al fuerte impacto de diferentes factores de género, como la maternidad y la conciliación de la vida laboral y familiar[25]. La empatía y las cuestiones éticas también fueron razones aducidas por nuestros participantes para cambiar de trayectoria profesional. Es una pena que no hayamos podido reclutar una muestra más amplia, ya que tal vez nos habría permitido determinar el peso de cada factor en la decisión final de dejar de trabajar con animales de laboratorio.

La gran mayoría de los participantes que trabajaban con animales de laboratorio en el momento del estudio lo hacían con ratones, y muchos menos trabajaban con animales grandes. Esto coincide con las estadísticas publicadas sobre el uso de animales en la investigación[18]. En general, los participantes creían que el uso de animales en su trabajo estaba justificado, aunque también dijeron que no hablaban de ello con personas ajenas a su círculo social inmediato. Esta actitud era mucho más frecuente en el caso de los participantes que trabajaban con perros y monos. De estos últimos, la mayoría trabajaba en organizaciones de investigación contratadas que a menudo trabajan en estudios de toxicidad farmacéutica, en los que generalmente se espera el uso de dos especies -un roedor y un no roedor[26,27]-. Estos estudios suelen ser necesarios para proporcionar datos de seguridad que respalden el desarrollo clínico y el registro de licencias de posibles nuevos productos farmacéuticos, y las especies no roedoras más utilizadas son los perros y los primates no humanos[28]. Este año, una petición para detener el uso de beagles en un estudio de toxicidad obtuvo más de un millón de firmas en España[29]. Un mes antes, se anunció el primer trasplante de un corazón de cerdo modificado genéticamente en un ser humano[30], sin provocar una respuesta tan negativa.

El presente estudio tiene ciertas limitaciones. En primer lugar, no preguntamos a las personas que trabajan con animales de laboratorio lo que pensaban sobre el uso de animales en la investigación, porque nos centramos más en si consideraban que su trabajo estaba justificado o no. Por lo tanto, no podemos comparar sus respuestas con las dadas por los otros grupos ni extrapolar nuestros datos a la población general española. En segundo lugar, el porcentaje de mujeres y de personas con un nivel de estudios superior en nuestra muestra era mayor que en la sociedad española en general, lo que hace que los resultados sean menos representativos.

CONCLUSIONES

Nuestro estudio aporta pruebas de que la escala filogenética es un factor importante que influye en la opinión de las personas sobre el uso de animales en la investigación. En concreto, nuestros resultados sugieren que existe una diferencia en el estatus moral entre los monos y los ratones, y entre los animales de compañía (perros) y los de granja (cerdos). Los resultados presentados aquí sirven para apoyar la idea de que el trabajo con animales de laboratorio es un tema sensible en España.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL), así como a todos los participantes del estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Dhai A. *The research ethics evolution: From Nuremberg to Helsinki.* South African Medical Journal. 2014;104(3):178-180.
2. Russel W and Burch R. *The Principles of Humane Experimental Technique.* London: Methuen & Co, 1959.
3. Bert B, Chmielewska J, Hensel A, *et al. The animal experimentation quandary: stuck between legislation and scientific freedom: More research and engagement by scientists is needed to help to improve animal welfare without hampering biomedical research.* EMBO Rep. 2016;17(6):790-792.
4. Kolar R. *ECVAM: desperately needed or superfluous? An animal welfare perspective.* Altern Lab Anim. 2002;30 Suppl 2:169-174.
5. De la Fuente M, Souto A, Caselli C, *et al. People's perception on animal welfare: why does it matter?* . Ethnobiology and Conservation. 2017;6(18):1.
6. Knight S and Barnett L. *Justifying Attitudes toward Animal Use: A Qualitative Study of People's Views and Beliefs.* Anthrozoös. 2008;21(1):31-42.
7. Ormandy EH and Schuppli CA. *Public Attitudes toward Animal Research: A Review. Animals (Basel).* 2014;4(3):391-408.
8. EC. European Commission Special Eurobarometer 340—Science and Technology. 2010. https://data.europa.eu / data/ datasets/ s806_73_1_ebs340?locale=en.
9. Pejman N, Kallas Z, Dalmau A, *et al. Should Animal Welfare Regulations Be More Restrictive? A Case Study in Eight European Union Countries.* Animals (Basel). 2019;9(4).
10. Goñi-Balentziaga O, Ortega-Saez I, Vila S, *et al. Working with laboratory rodents in Spain: a survey on welfare and wellbeing.* Lab Anim Res. 2021;37(1):18.
11. ECI. Stop Vivisection. 2015. http://www.stopvivisection.eu/en.
12. Ncad. NCad opinion Transition to non-animal research 2016.https://www.ncadierproevenbeleid.nl/documenten/rapport/2016/12/15/ncad-opinion-transition-to-non-animal-research.
13. Revill J. *Swiss reject ban on animal testing in referendum.* 2022. https://www.reuters.com/world/europe/switzerland-vote-becoming-first-nation-ban-animal-testing-2022-02-13/.
14. Kutschenko LK. *Relevant Similarity in the Light of Biomedical Experimentation.* In: Kristin Hagen AS, Felix Thiele, eds. Large animals as biomedical models: Ethical, societal, legal and biological aspects 51. Neuenahr-Ahrweiler: Europäische Akademie. 2012. p. 69-83.
15. Heeger R. *Experimenting on animals: When does their size matter morally?* In: Kristin Hagen AS, Felix Thiele, eds. Large animals as biomedical models: Ethical, societal, legal andbiological aspects. 51. Neuenahr-Ahrweiler: Europäische Akademie. 2012. p. 13-23.
16. Morata Tarifa C, López Navas L, Azkona G, *et al. Chimeras for the twenty-first century.* Crit Rev Biotechnol. 2020, 40(3):283-91.
17. EC. Summary Report on the statistics on the use of animals for scientific purposes in theMember States of the European Union and Norway in 2018.2021. https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/SWD_%20part_A_and_B.pdf
18. MAPA. Informe sobre usos de animales en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. 2019. https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/informedeusodeanimalesen2019_tcm30-550894.pdf.
19. Walker RL and Eggel M. *From Mice to Monkeys? Beyond Orthodox Approaches to the Ethics of Animal Model Choice.* Animals (Basel). 2020;10(1):77.
20. MAPA. El sector de la carne en cifras. 2020. https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/estadisticas/indicadoreseconomicossectorporcino2020_tcm30-379728.pdf.
21. Krings VC, Dhont K, Salmen A. *The Moral Divide Between High- and Low-Status Animals: The Role of Human Supremacy Beliefs.* Anthrozoös. 2021:787-802.
22. Sandgren EP, Streiffer R, Dykema J, *et al. Attitudes toward animals, and how species and purpose affect animal research justifiability, among undergraduate students and faculty.* PLoS One. 2020;15(5):e0233204.
23. Murray J, Bauer C, Vilminot N, *et al. Strengthening Workplace Well-Being in Research Animal Facilities.* Front Vet Sci. 2020;7:573106.
24. Goñi-Balentziaga O, Vila S, Ortega-Saez I, *et al. Professional Quality of Life in Research Involving Laboratory Animals.* Animals (Basel). 2021;11(9):2639.

25. OMCI. Estudio sobre la situación delas jóvenes investigadorasen España. Secretaría General Técnica del Ministerio de Ciencia e Innovación.; 2021. https://www.culturaydeporte.gob.es/ dam/jcr:875ee2f6-37e7-494e-9767-6434f7ee1b06/informe-jovenes-investigadoras-esp.pdf.

26. *ICHM3(R2). Nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals. In: International Conference on Harmonisation* (ICH). 2009. https://www.ema.europa.eu/en/ich-m3-r2-non-clinical-safety-studies-conduct-human-clinical-trials-pharmaceuticals.

27. *ICHS9. Nonclinical evaluation for anticancer pharmaceuticals. In: International Conference on Harmonisation (ICH).*2010. https://www.ema.europa.eu/en/ich-s9-non-clinical-evaluation-anticancer-pharmaceuticals.

28. Prior H, Haworth R, Labram B, *et al. Justification for species selection for pharmaceutical toxicity studies.* Toxicol Res (Camb). 2020;9(6):758-770.

29. Change.org. Salvar a los 38 cachorros Beagle del laboratorio Vivotecnia de su ejecución.2022. https://www.change.org/p/universidad-de-barcelona-salvar-a-los-38-cachorros-beagle-del-laboratorio-vivotecnia-de-su-ejecuci%C3%B3n.

30. Perform Historic First Successful Transplant of Porcine Heart into Adult Human with End-Stage Heart Disease.2022.https://www.medschool.umaryland.edu/news/2022/University-of-Maryland-School-of-Medicine-Faculty-Scientists-and-Clinicians-Perform-Historic-First-Successful-Transplant-of-Porcine-Heart-into-Adult-Human-with-End-Stage-Heart-Disease.html.

LA SECAL
CIENCIA animal
VIDA
www.secal.es

Utilización de marcadores permanentes para la identificación de ratones

Yamile Pérez[1], Sonia Nuncio[1], y Marta Giral[2]
[1]*Charles River Laboratories España*
[2]*Animal Research Facilities, Almirall S.A.*

Palabras clave: ratón, marcaje, rotulador.

PLANTEAMIENTO

Al realizar procedimientos con ratones, muchas veces tenemos que identificarlos individualmente para poder asignarles un tratamiento, realizar una observación, etc. Existen muchas maneras de hacerlo, pero una de las más sencillas y económicas es la utilización de rotuladores o marcadores permanentes para realizar marcas en la cola.

En nuestra práctica diaria, con frecuencia hemos de repasar esas marcas porque van perdiendo color y resultan difíciles de distinguir –especialmente en estudios de larga duración–, lo que implica una manipulación extra de los animales. Por otra parte, a veces hemos observado que el material de nidificación queda ligeramente teñido por el marcador usado.

Nos preguntamos dos cosas

- ¿Hay diferencia en la duración de las marcas producidas por diferentes tipos de rotuladores?
- ¿Pueden estos rotuladores no ser totalmente inocuos para los animales, o interferir en los procedimientos?

INDICIOS

Para intentar contestar a alguna de estas preguntas, diseñamos un sencillo estudio comparativo entre tres tipos de rotuladores (ver Figura 1). Empleamos 16 ratones de la cepa BALB/cByJ (JanvierLabs, Le Genest-Saint-Isle, Francia), de 11 meses de edad, en los que realizamos un mismo marcaje (3 líneas horizontales en la base de la cola), y los distribuimos de la siguiente forma (ver Tabla 1):

Tabla1.- Datos de los animales del estudio y rotulador utilizado.

Cubeta	N de animales	Sexo	Rotulador (marca comercial)
1	3	♂	Disnack rojo
2	3	♂	SkinMarkerCovidien
3	2	♂	Edding 3000 rojo
4	3	♀	Disnack rojo
5	3	♀	SkinMarkerCovidien
6	2	♀	Edding 3000 rojo

Dos de los rotuladores utilizados (*Disnak y Edding*) son productos de papelería, mientras que el *SkinMarkerCovidien* es un marcador a base de violeta de genciana, utilizado en cirugía humana para realizar marcas en la piel.

Imagen suministrada por la autoría

Figura 1.- rotuladores empleados para realizar marcas en las colas de los ratones, cuyos resultados comparamos.

Los animales se alojaron en cubetas autoventiladas (IVC TecniplastGM500, Buguggiate, Italia) con lecho de maíz (BED-o'cob 1/4", Envigo, Indianapolis, EE. UU.), y material de enriquecimiento ambiental. Concretamente, en cada cubeta disponían de una MouseHouse (Tecniplast), tubos de cartón (*Play tunnels* 75x38x1,25 mm, Envigo), y material de nidificación (*Cocoon*, Envigo).

Inmediatamente tras el marcaje, y 5 minutos después, se observó el comportamiento de acicalamiento de los ratones, tanto sobre sí mismos (auto-acicalado o *selfgrooming*) como sobre los compañeros de jaula (*allogrooming*).

Además, se realizó un seguimiento de las marcas durante 20 días, registrando su estado cada 4 días. Concretamente, se hacían dos valoraciones, con sendas escalas subjetivas:

- Visibilidad de las marcas:

  0: completamente borrada; no se distingue.

  1: parcialmente borrada; se nota con dificultad.

  2: se visualiza perfectamente.

- Cambió de coloración del material de nidificación (*Cocoon*):

  0: no teñido.

  1: ligeramente teñido.

  2: muy teñido.

RESULTADOS

Comportamiento de *selfgrooming*

Ninguno de los animales realizó movimientos de auto-acicalamiento justo tras el marcaje.

Cinco minutos después, los machos marcados con *Disnak* y *Edding*, se acicalaban a sí mismos de manera evidente; no así las hembras.

Comportamiento de *allogrooming*

Sólo los machos marcados con *Disnak* realizaron *allogrooming*.

Duración de las marcas

La evolución de la visibilidad de las marcas se representa en la Figura 2.

El marcador más duradero en las colas de los animales fue el de marca *Edding* 3000, que se observó perfectamente hasta el día 12, y pudo distinguirse incluso al final del estudio (día 20).

Los otros dos marcadores se empezaron a ver algo borrosos al octavo día, y desaparecieron por completo entre el día 12 y el 16.

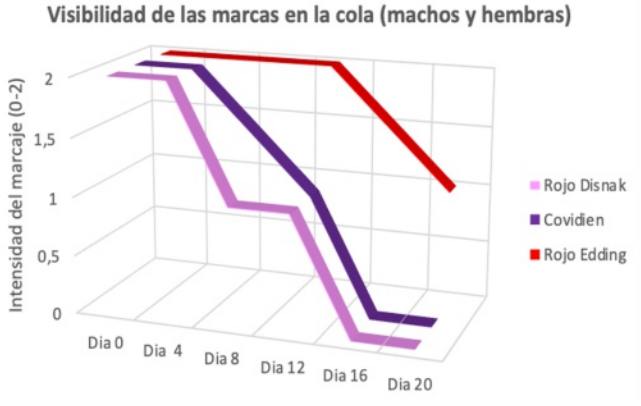


Imagen suministrada por la autoría

Figura 2.- Representación gráfica de la evolución de las marcas realizadas en las colas de los ratones con los tres rotuladores.

Tinción del material de nidificación

El marcador *Covidien* no dejó restos en el material de nidificación.

Tanto el *Disnak* como el *Edding* dejaron restos en el Cocoon; aunque la tinción apareció antes con el *Disnak* (día 4 *vs* día 8).

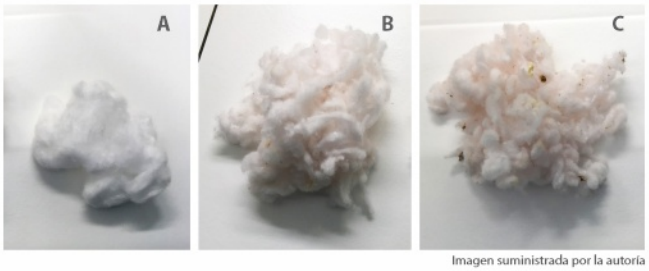


Imagen suministrada por la autoría

Figura 3.- A. Material de nidificación (Cocoon) recién puesto en la cubeta. **B.** Material a los 20 días del estudio en cubetas de ratones marcados con Edding 3000. **C.** Material a los 20 días del estudio, en cubetas de animales marcados con Disnak.

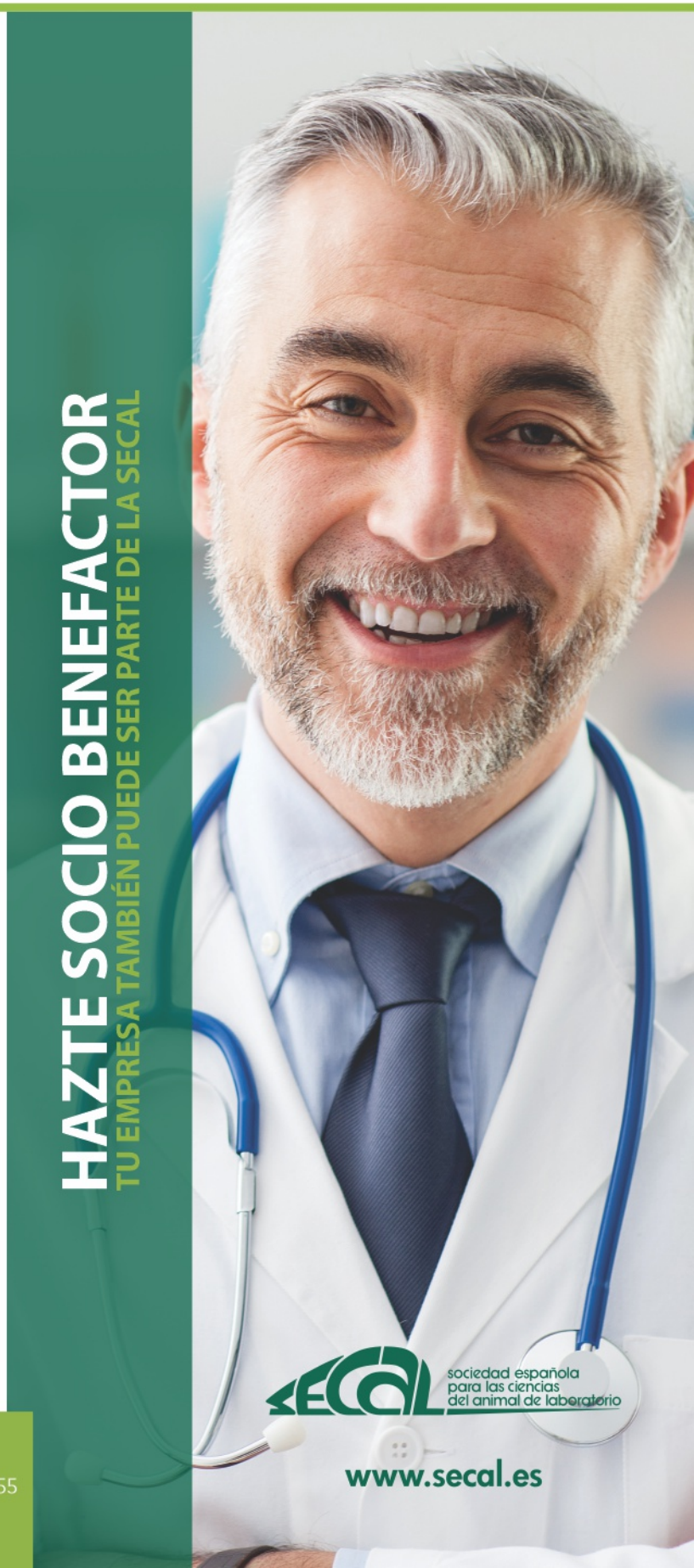
CONCLUSIONES

La elección de uno u otro tipo de marcador permanente para el marcaje de ratones puede no ser una cuestión baladí. Hemos de tener en cuenta la durabilidad de las marcas para tratar de evitar re-marcajes y, también hay que considerar las posibles alteraciones que puedan causar en los animales.

Nosotros hemos observado diferencias en el comportamiento de acicalamiento en los ratones macho. Concretamente, los rotuladores de papelería lo estimulaban, lo cual sugiere que algún componente pueda ser aversivo, o incluso nocivo.

La ficha de seguridad del marcador *Edding 3000* rojo (el que mejor resultado dio en cuanto a duración) indica que entre sus componentes se incluyen sustancias como el 1-metoxi-2-propanol y el etanol, que pueden producir somnolencia y mareos en las personas, y causar irritación ocular grave. Es difícil saber si la pequeña cantidad de colorantes, solventes o resinas aplicadas en la cola es capaz de producir algún tipo de alteraciones significativas en los animales, pero en cualquier caso es potencialmente tóxico, y/o podría interferir en algún tipo de estudio.

A la vista de estos indicios, pensamos que es recomendable utilizar un marcador de violeta de genciana, ya que su duración es aceptable (comparable a la de uno de los rotuladores de papelería), parece menos aversivo para los animales, y no tiñe el material de nidificación. La violeta de genciana no es tóxica, ni irritante y el olor es indetectable, al menos para el olfato humano.



Allentown®

Improving Life – it's in our DNA.®

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 though scientific discovery.

DISTRIBUIDOR EN ESPAÑA **WWW.SODISPAN.COM**

Jordi Guinea Mejías

Jordi Guinea Mejías es doctor en Biología, exjefe de la Unidad de Experimentación Animal de Biología de la Universitat de Barcelona (UB).

Desde cuando eres socio de la SECAL y que te motivó para unirte a nuestra sociedad.

Soy socio de la SECAL desde 1998, poco después de empezar a trabajar en el entonces llamado Estabulario de Biología. En aquella época no conocía la existencia de la Sociedad, me hablaron de ella y comprendí que era importante adentrarme en el mundo del animal de laboratorio. Tenía experiencia como investigador –tesis doctoral en peces– y como docente de Fisiología Animal, en la Facultad de Biología de la Universitat de Barcelona, pero sentía que tenía que aprender cosas nuevas en otros aspectos.

Mi primer congreso fue el de Palma de Mallorca en 1999. Allí empecé a tomar conciencia de la dimensión del ámbito de la Ciencia del Animal de Laboratorio, tanto en los aspectos técnicos, sanitarios como de utillaje. También tuve la ocasión de conocer en persona a otros miembros, aprender de su experiencia, consultar dudas y, como "novato", tranquilizarme al constatar que, más o menos, todos teníamos los mismos problemas. Tanto en los congresos como en el día a día puedes pedir opinión a los colegas y enseguida te responden. Siempre me he encontrado cómodo en la SECAL, y animo especialmente a los investigadores que trabajan con animales a que se hagan socios.

Para conocerte un poco más, cuéntanos tu experiencia dentro del mundo de la ciencia del animal de laboratorio.

Mis primeros pasos en la biología y el manejo de animales de laboratorio fueron como investigador y como docente. Posteriormente, relacionado con la aplicación de la normativa que regula la utilización de animales para experimentación y otras finalidades científicas, empecé a trabajar en el Estabulario de Biología, primero como interino y luego con plaza fija. A pesar de tener la acreditación de personal investigador, por experiencia probada, me pareció interesante realizar el curso; siempre se aprenden cosas nuevas. Más tarde, realicé el máster de asesor en bienestar animal en la Universitat Autònoma de Barcelona. De ahí salimos la primera promoción de asesores. Fue intenso, muchas horas cada día, aun así, guardo muy buen recuerdo de aquellos tiempos. Allí conocí a profesores y colegas de otras universidades y centros privados. Convivimos durante muchos días y con el devenir de los años ha surgido una sincera y bonita amistad entre nosotros. Me viene a la memoria que tanto profesores como alumnos teníamos ilusión y ganas. Los profesores ganas de enseñarnos y de compartir sus experiencias. Los alumnos ganas de aprender, prácticamente todo era nuevo para nosotros. Muchas clases eran interactivas y no teníamos miedo a equivocarnos al opinar; el ambiente era muy agradable y sano.

Me viene a la memoria que tanto profesores como alumnos teníamos ilusión y ganas. Los profesores ganas de enseñarnos y de compartir sus experiencias. Los alumnos ganas de aprender, prácticamente todo era nuevo para nosotros. Muchas clases eran interactivas y no teníamos miedo a equivocarnos al opinar; el ambiente era muy agradable y sano.

Una experiencia muy formativa fue la colaboración en el diseño y puesta a punto de lo que se vino a denominar Estabulario Húmedo: una instalación para animales acuáticos de agua dulce y marina, básicamente peces. Este tipo de instalaciones son únicas, hechas a medida y no se pueden probar previamente, por mucho que le des vueltas al diseño, hay que ponerlas en funcionamiento para detectar los problemas. Me dio muchos dolores de cabeza y algunos madrugones por salto de alarmas, pero también muchas satisfacciones. Me gusta y se me da bastante bien entender cómo funcionan las cosas y he dedicado muchas horas, junto con el personal del estabulario, a detectar y reparar problemas de esta instalación.

Dado el momento en el que me incorporé al Estabulario de Biología, he vivido de primera mano la implantación de las distintas normativas que han ido apareciendo, la puesta en marcha del Comité Ético de la UB y por requisitos del puesto de trabajo, he ido ampliando mis estudios sobre los animales de laboratorio, que junto a las experiencias vividas, ha completado mi formación como investigador. De hecho, no sabría decirte cuál de las dos me ha aportado más, creo que ambos tipos de conocimiento se complementan muy bien. Mirando hacia atrás y dejando de lado los momentos de estrés, la experiencia ha sido positiva y enriquecedora.

Cuéntanos un poco tu trabajo dentro del animalario.

Siempre he tenido claro que un estabulario o un animalario es un servicio. Su función es, en el sentido amplio de la palabra, ayudar a los científicos a realizar sus investigaciones. Por una parte, estaría la gestión de las instalaciones y del personal de cara a que el mantenimiento y el cuidado de los animales sea el adecuado y se ajuste a los requerimientos de la normativa, en la medida de lo posible. Por otra, las tareas como asesor en bienestar animal y miembro del comité ético, asesorando a los investigadores en aspectos técnicos relacionados con el bienestar animal y evaluando sus procedimientos y proyectos.

En algunos momentos, me ha podido mi tendencia a supervisar la maquinaria y las instalaciones, especialmente la de los peces que son muy delicadas y pronto aprendí que "si todo funciona correctamente un viernes por la tarde, no toques nada" a no ser que quieras irte a casa más tarde de lo habitual.

Pronto aprendí que "si todo funciona correctamente un viernes por la tarde, no toques nada" a no ser que quieras irte a casa más tarde de lo habitual.

Sabemos que el trabajo en los animalarios muchos días es frenético, pero has tenido tiempo para dedicarte a otras actividades como la investigación o la formación, si es así cuéntanos un poco lo que has hecho.

Sí, la Universitat de Barcelona es muy grande y a parte de los investigadores propios, hay investigadores de otras entidades y centros que también son usuarios de los animalarios de la UB. Esto genera un volumen de trabajo elevado, especialmente el relacionado con el comité ético al que dedicamos buena parte de nuestra jornada. Por este motivo no he podido dedicarme a la investigación, a pesar de que algunos investigadores me hayan propuesto colaborar con ellos. En algunos momentos, sí que he echado de menos el poder investigar. En cambio, mi faceta de docente la he podido mantener. Durante muchos años he impartido clases teóricas y prácticas en cursos de formación para la obtención de distintas acreditaciones y funciones. Me ha gustado mucho mantener el contacto con los alumnos, especialmente en las clases prácticas en las que la interacción es mucho más próxima que en las clases teóricas.

Cuéntanos un poco tu experiencia con los investigadores, ya que tú estuviste en los dos bandos.

Al principio fue complicada. Los investigadores estaban acostumbrados a diseñar e iniciar sus estudios por su cuenta. De pronto, una normativa implanta los comités éticos y la figura del asesor en bienestar animal, que evalúan, rectifican y corrigen sus procedimientos. Faltó cierto tiempo y paciencia para que los investigadores se dieran cuenta que yo no pretendía entorpecer su tarea si no hacerles entender que la situación había cambiado y mi empeño era ayudarles en esa nueva etapa. Tal como he comentado, he considerado mi trabajo como un servicio y poco a poco así lo han visto los investigadores. Creo que mi experiencia como investigador me ha ayudado mucho. Tener un lenguaje y bagaje similares, ha facilitado las conversaciones y las discusiones entre nosotros a la hora de revisar los procedimientos y proyectos. También me ha permitido empatizar con ellos comprendiendo

sus "prisas". Vivimos en una sociedad muy competitiva, en la que los investigadores están sometidos a mucha presión para publicar y presentar resultados de sus proyectos.

En relación a los investigadores, he notado a faltar que sean miembros de la SECAL y participen en nuestras jornadas y congresos. El haber estado en ambos lados, como tú dices, me ha permitido comprobar, que en general, investigadores y técnicos superiores especialistas nos movemos en direcciones paralelas que pocas veces se cruzan. De la misma forma que las jornadas y los congresos me han aportado conocimientos que han cambiado mi forma de percibir el trabajo con animales de laboratorio; creo que los investigadores mejorarían como plantear y diseñar sus estudios con animales. Una colaboración más estrecha entre los dos colectivos enriquecería a ambos.

Mi experiencia como investigador me ha ayudado mucho. Tener un lenguaje y bagaje similares, ha facilitado las conversaciones y las discusiones entre nosotros a la hora de revisar los procedimientos y proyectos. También me ha permitido empatizar con ellos comprendiendo sus "prisas". Vivimos en una sociedad muy competitiva, en la que los investigadores están sometidos a mucha presión para publicar y presentar resultados de sus proyectos.

¿Qué es lo que más te ha gustado de tu trabajo?

El que permitió mi continuidad en el entorno universitario e indirectamente en el de la investigación. Sentirme útil tratando de mejorar las instalaciones existentes y poniendo a punto nuevas; reorganizando las tareas para que fueran más eficientes y poder dar mejor servicio a los investigadores. Haber aprendido muchas cosas enriqueciendo mi formación. Las horas "trasteando" en el Estabulario Húmedo. La relación personal con los investigadores y el personal del Estabulario de Biología, fomentando un trato cordial, relajado y respetuoso.

Nos han chivado que te has jubilado y por ese motivo queremos saber cuáles han sido tus contribuciones durante estos años y que nos dejas de herencia.

Seguramente, debido a mi formación como fisiólogo especialista en peces, mi mayor aportación ha sido en el Estabulario Húmedo. A principios de los 2000 no era habitual trabajar con peces en las universidades. En la Facultat de Biologia de la UB, algunos fisiólogos y zoólogos si lo hacían, pero al carecer de instalaciones propias, tenían que hacerlo en las del CSIC, el IRTA o en el medio natural. Surgió la oportunidad de crear unas instalaciones específicas y así los fisiólogos pudieron trabajar con especies de interés comercial como trucha, dorada o lubina; y los zoólogos con especies salvajes como barbo, salaría o pez sol.

Con el tiempo se han corregido y mejorado aspectos del diseño, funcionalidad y seguridad. Aun así quedan algunas mejoras por hacer. No obstante, creo que los investigadores están contentos de poder trabajar en la propia Facultad a pocos metros de sus despachos, pudiendo realizar estudios de larga duración y un seguimiento diario y preciso de sus experimentos.

Cuéntanos algún proyecto en el que te gustaría participar o hacer, aunque sea ahora que te has jubilado.

Con el transcurso del tiempo ha incrementado el uso de los peces como animales de laboratorio, especialmente algunas especies como el pez cebra. Hubo un momento en el que se planteó la creación, en el Estabulario Húmedo, de una zona para el mantenimiento y utilización de pez cebra en racks, con un control fino de la temperatura y la calidad del agua. Este proyecto tuvo el soporte de muchos investigadores de la Facultad, pero finalmente, el proyecto no se llevó a cabo. Si algún día se retomara, me gustaría poder colaborar.

Para terminar, ¿crees que con lo vivido durante la pandemia, la creación de vacunas, tratamientos... se va a dar más importancia al animal de laboratorio ya sea la sociedad y/o la administración?

Sí, algo, pero no lo suficiente. Durante las primeras etapas de la pandemia, los medios de comunicación trataron, de manera obsesiva, la evolución de la pandemia y la carrera de los laboratorios farmacéuticos para obtener una vacuna. Generalmente cuando se produce un avance en medicina o aparece un nuevo fármaco que resuelve o mejora un problema de salud, las noticias hacen énfasis en los beneficios que supone,

pero pocas veces se menciona que, en algunas etapas del desarrollo han intervenido los animales de laboratorio y su importancia.

Generalmente cuando se produce un avance en medicina o aparece un nuevo fármaco que resuelve o mejora un problema de salud, las noticias hacen énfasis en los beneficios que supone, pero pocas veces se menciona que, en algunas etapas del desarrollo han intervenido los animales de laboratorio y su importancia.

El uso de animales en la investigación ha sido, es y será un tema polémico socialmente. Ante esta polémica, se han emitido algunos programas en los que los argumentos esgrimidos en contra de su uso han sido poco rigurosos. A veces ha dado la sensación que se buscaba más el morbo del enfrentamiento que aportar información. Los acuerdos de transparencia subscritos por universidades y centros de investigación aportan datos concretos de las finalidades del uso de los animales de laboratorio, pero creo que son consultados por una parte pequeña de la sociedad.

Se ha avanzado mucho en el remplazo de animales en investigación mediante pruebas in vitro, modelos informáticos, organoides, pero aún estamos lejos del remplazo total.

"El hombre hace uso de otros animales, de la misma manera que lo hacen otras especies, pero tenemos consciencia de este uso, por lo que debemos hacerlo con respeto y dignidad."

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

sociedad española
para las ciencias
del animal de laboratorio

www.secal.es

¿Te gusta la fotografía?

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

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

ENVÍANOS TUS FOTOS A:

direccion.revista@secal.es

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

Formato JPG
Alta resolución: (mínimo) 300 ppp
Orientación en vertical: 21,4 cm x 28,4 cm

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

sociedad española
para las ciencias
del animal de laboratorio

Powering your research development

vivotecnia
management & services

Profesionales al servicio de la investigación

Servicios integrales para Animalarios

...

Externalización de servicios de Animalarios

...

Formación de personal

...

Diseño de Instalaciones

...

Alquiler y gestión de Instalaciones

...

Consultoría y Asesoramiento

...

www.vivotecnia-ms.com

The Weight is Over.

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

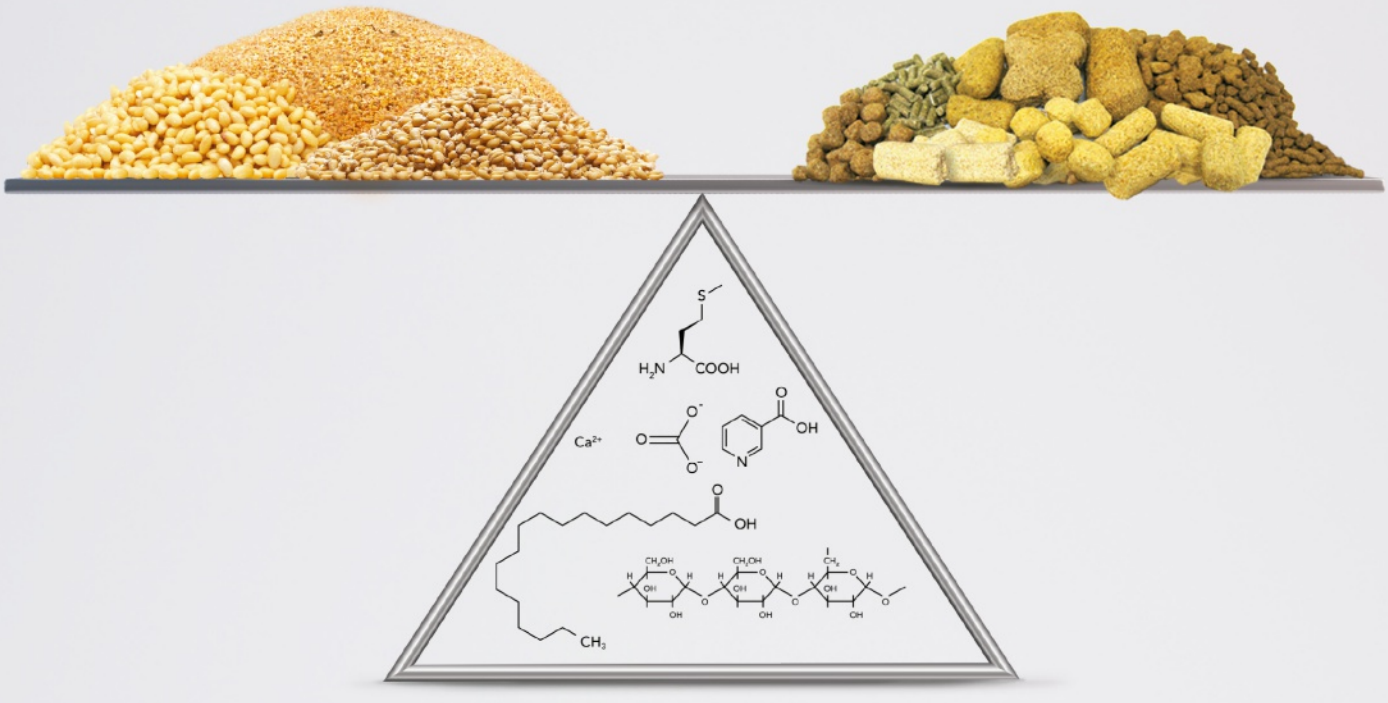
charles river
accelerating drug development. exactly.

services@eu.crl.com
www.criver.com

ENVIGO

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