

Introducción a la Experimentación Animal en Pediatría y Obstetricia 2015



Red de Salud Materno Infantil y del Desarrollo
Instituto Carlos III
Ministerio de Economía y Competitividad

Cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública o transformación de esta obra solo puede ser realizada con la autorización de sus titulares, salvo excepción prevista por la ley. Dirijase a CEDRO (Centro Español de Derechos Reprográficos, www.cedro.org) si necesita fotocopiar o escanear algún fragmento de esta obra.

© 2015 ERGON
C/ Arboleda, 1. 28221 Majadahonda (Madrid)

ISBN: 978-84-16270-??-?
Depósito Legal: M-?????-2015

AUTORES

COORDINADOR

Jesús López-Herce Cid

Servicio de Cuidados Intensivos Pediátricos.

Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.

Instituto de investigación Sanitaria del Hospital Gregorio Marañón. Madrid.

Profesor Titular de Pediatría.

Universidad Complutense de Madrid.

AUTORES

José María Bellón Cano

Instituto de Investigación Sanitaria del

Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.

Justo Javier Escobar Cubiella

Grupo de Investigación en Perinatología.

Instituto de Investigación Sanitaria La Fe. Valencia.

Javier Joya Cecilia

Instituto de Investigación.

Hospital del Mar. Barcelona.

Jesús López-Herce Cid

Servicio de Cuidados Intensivos Pediátricos.

Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.

Instituto de investigación Sanitaria del Hospital Gregorio Marañón. Madrid.

Profesor Titular de Pediatría.

Universidad Complutense de Madrid.

Leopoldo Martínez Martínez

*Jefe de Sección de Cirugía Pediátrica.
Hospital Universitario La Paz. Madrid.
Profesor Asociado al Departamento de Pediatría.
Universidad Autónoma de Madrid.*

Victoria Mielgo Turuelo

*Instituto de Investigación Biosanitaria BioCruces.
Bilbao.*

María del Carmen Rey Santano

*Instituto de Investigación Biosanitaria Biocruces.
Bilbao.*

Javier Urbano Villaescusa

*Servicio de Cuidados Intensivos Pediátricos.
Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.
Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Gregorio Marañón. Madrid.*

PRÓLOGO

La Red de Salud Materno Infantil y del Desarrollo se constituyó e 2008 por iniciativa del Profesor Adolfo Valls-i-Soler (q.e.p.d) para aglutinar a todos los grupos de nuestro país que dedicábamos nuestros esfuerzos a realizar no solo una actividad asistencial sino además una labor investigadora acreditada por el nivel de la producción científica. Dentro de los 12 grupos que se incorporaron a la red SAMID había unos cuantos con una gran inquietud por el desarrollo de modelos experimentales animales que permitiesen llevar a la práctica hipótesis sobre la fisiopatología de procesos patológicos, ensayo de nuevos fármacos, descubrimiento de biomarcadores, etc. Imposibles de realizar directamente en humanos. El modelo animal, que en nuestro medio no goza de mucha relevancia dada la dificultad de tener instalaciones, tiempo y especialmente financiación, es un medio obligado en los países científicamente más productivos de nuestro entorno europeo. La investigación con mamíferos es un paso previo e ineludible para la traslación a la clínica humana. Es más, aquellos grupos que desarrollan un modelo experimental eficaz y depurado se ponen fácilmente a la vanguardia de la investigación traslacional.

El manual de *Introducción a la Experimentación Animal en Pediatría y Obstetricia* es el fruto del empeño de un grupo de investigadores de la Red SAMID pero especialmente del Profesor Jesús López-Herce. Su grupo tiene una larga trayectoria en investigación animal con un modelo en cerdo que les ha permitido abordar desde diferentes ópticas y con técnicas variadas aspectos relevantes de la fisiopatología de la parada cardiaca en la etapa pediátrica, y contribuir con un enorme peso específico a la confección de las Guías Clínicas Internacionales sobre este importante aspecto clínico. Además del Dr López-Herce, un grupo entusiasta de investigadores pertenecientes a otros grupos de la Red SAMID han aportado su experiencia, habilidad y capacidad docente en el Primer Curso sobre Experimentación Animal en Pediatría y Obstetricia celebrado en las dependencias del Hospital Gregorio Marañón de Madrid.

Los alumnos han recibido una formación teórica que ha incluido el diseño y la ética en la investigación animal y, además unas prácticas intensas y reales con diversos modelos animales como cerdo, pez cebra, etc.

La coordinación de la Red SAMID comprendiendo la importancia de este curso ha avalado desde el primer momento la realización y la edición de este manual que es un complemento perfecto para el curso. Los jóvenes así capacitados formarán las futuras generaciones de investigadores de las áreas pediátrica, neonatal y obstétrica de nuestro país y contribuirán, indudablemente, al avance de los conocimientos de la ciencia médica.

Quiero agradecer a todos los profesores pero especialmente a Jesús López-Herce su admirable y contagioso entusiasmo, su dedicación, y el esfuerzo que ha realizado en organizar y coordinar el curso de experimental así como la edición de este manual. ¡Enhorabuena a todos los co-autores!

Máximo Vento Torres

*Coordinador Nacional de la Red de Salud Materno Infantil
y del Desarrollo (SAMID)*

Servicio de Neonatología

Hospital Universitario y Politécnico La Fe

Valencia

ÍNDICE

1.	Introducción	9
	Jesús López-Herce Cid	
2.	Conceptos, aplicaciones y ética	11
	Javier Urbano Villaescusa	
3.	Diseño de estudios	19
	José María Bellón Cano	
4.	Experimentación animal en Cirugía pediátrica	31
	Leopoldo Martínez Martínez	
5.	Modelos animales en Neonatología	39
	Victoria Mielgo Turuelo y M ^a del Carmen Rey Santano	
6.	Modelos animales pediátricos en cerdos	49
	Jesús López-Herce Cid	
7.	Modelos animales en pez cebra	57
	Javier Joya Cecilia	
8.	Recogida, procesamiento y conservación de la muestra	63
	Justo Javier Escobar Cubiella	

INTRODUCCIÓN

Jesús López-Herce Cid

El manual de *Introducción a la Experimentación Animal en Pediatría y Obstetricia* recoge la experiencia de diversos grupos de la Red de Salud Materno Infantil y del Desarrollo (Red SAMID; Instituto Carlos III; Ministerio de Economía y Competitividad) y es la base teórica del Curso de experimentación animal pediátrica y obstétrica.

Uno de los objetivos de la Red de Salud Materno-Infantil y del Desarrollo es la potenciar una investigación experimental de calidad. Para ello además de aumentar el número de grupos que desarrollan investigación experimental en Pediatría y Obstetricia es fundamental formar a los investigadores. Esta formación debe incluir, además de los cursos de acreditación oficial categoría B y C, cursos de específicos, fundamentalmente, orientados a la formación y entrenamiento en modelos animales a utilizar en experimentación pediátrica y neonatal.

Este manual no pretende ser un tratado extenso de las bases teóricas de la experimentación animal, ni una descripción exhaustiva de las técnicas experimentales. El texto pretende ser una guía sencilla y práctica para los alumnos del curso, que también puede servir de ayuda para otros profesionales que quieren empezar a realizar investigación animal sobre problemas clínicos pediátricos y obstétricos.

El curso de experimentación animal tiene una parte teórica sencilla sobre la experimentación animal pediátrica, el diseño de estudios y diversos modelos animales utilizados en Pediatría y Obstetricia, y unas prácticas de diseño de estudios y modelos animales en ratas y cerdos neonatales y pediátricos.

Este curso está dirigido a pediatras, cirujanos pediátricos, ginecólogos, médicos residentes de pediatría y cirugía pediátrica, ginecólogos, biólogos y otros investigadores sobre temas pediátricos y obstétricos

El curso tiene como objetivo que los alumnos conozcan las posibilidades de experimentación animal en investigación pediátrica y las aplicaciones de los

modelos animales a otras actividades (docentes y evaluación de tecnologías y fármacos); que aprendan a realizar un diseño sencillo de estudio animal y las nociones básicas de instrumentación en animales.

Los profesores son pediatras, cirujanos pediátricos y biólogos expertos en investigación animal translacional y acreditados en experimentación animal.

El curso está organizado por la Red de Salud Materno Infantil y del Desarrollo (RED SAMID II), ha sido desarrollado gracias al apoyo del Dr. Adolfo Valls, primer coordinador de la Red SAMID, está autorizado por la Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio de la Comunidad de Madrid y validado por la Asociación Española de Pediatría (Nº 20141015-02-Fid35).

CONCEPTOS, APLICACIONES Y ÉTICA

Javier Urbano Villaescusa

Los objetivos de este capítulo son describir los conceptos básicos en experimentación animal, comentar las posibles aplicaciones en pediatría y obstetricia, y exponer las consideraciones éticas propias de la investigación con animales.

CONCEPTOS

Ciencias del animal de laboratorio

Comprende los conocimientos que se han desarrollado sobre el estudio de los animales de laboratorio, y sobre los procedimientos que se realizan en ellos.

Es necesario conocer de forma adecuada las peculiaridades zoológicas, genéticas y del comportamiento para establecer modelos que sean extrapolables y útiles al conocimiento científico. También incluye las técnicas sobre el manejo adecuado de los animales para evitar daños en el animal y en el personal que los manipula.

Por otro lado, se describen los diferentes procedimientos que se pueden realizar con los animales, los modelos que han sido validados y sus características, y otros aspectos metodológicos.

Animal de laboratorio

Se considera como animal de laboratorio a cualquier ser vivo animal (vertebrado o invertebrado) que sea utilizado con fines científicos durante un experimento. El uso de animales de laboratorio no es exclusivo de la biomedicina, sino también por las ciencias veterinarias y agropecuarias.

Reactivo biológico

En la década de 1960 se establece el concepto de que el animal de laboratorio debe ser como un "reactivo biológico", que produzca una respuesta

fiable y reproducible las veces que se utilice. Con esta exigencia se trata de evitar la variabilidad correspondiente a las diferencias entre los animales de una muestra para realizar un determinado experimento. El objetivo ideal sería que el experimento se pudiese realizar exactamente con el mismo animal y en las mismas condiciones, para poder comprender mejor las diferencias entre la intervención y el control. Para conseguirlo, debe existir una homogeneidad somática (especie, raza, tamaño, peso, edad, sexo), genética (animales consanguíneos, isogénicos o incluso clónicos), y sanitaria (evitando estados patológicos en los animales). Se establecen unos controles: los animales deben cumplir unos estándares biológicos y ambientales (animales estandarizados).

Animal de laboratorio como “paciente”

En los últimos años este concepto ha cambiado. No solo es importante la uniformidad de los animales, sino también su bienestar. Se pasa de un concepto basado en la población a un concepto basado en el individuo, al que se deben proporcionar las condiciones adecuadas que permitan desarrollar sus pautas de comportamiento, y minimizar el estrés y el dolor.

Servicios de producción y experimentación animal (SPEA)

En estos centros se producen animales de experimentación de alta calidad, y se pueden mantener cepas muy específicas, libres de intromisiones animales o de personas. Suelen ofrecer apoyo a la investigación mediante asesoramiento, bibliografía, suministro de animales, etc.

Experimentación animal

Comprende un doble concepto, basándose en dos puntos de vista:

- Investigador: cualquier actividad que se desarrolla para evidenciar o aclarar un fenómeno biológico en el que se utilizan animales de laboratorio.
- Proteccionista: cualquier actividad que entrañe un ataque al estado de bienestar del animal.

Se incluyen las actuaciones que puedan dar lugar al nacimiento de animales de experimentación.

Es importante destacar que para interpretar los resultados de un estudio con animales de experimentación se debe analizar su transposición de una especie a otra. Ningún modelo animal es perfecto. Sin embargo, la suma de diferentes modelos experimentales animales resulta en una aproximación que incrementa el conocimiento sobre el fenómeno biológico estudiado. Por otro lado, tampoco existen sustitutos perfectos de los modelos animales.

Modelo animal

El objetivo de un modelo animal experimental es reproducir un efecto biológico presente en el sujeto original. Este efecto se puede estudiar a nivel general, observando las interacciones de la intervención sobre los diferentes sistemas y entre sí, o a nivel más específico, sobre determinados tejidos o células, observando mecanismos de acción más concretos.

El desarrollo de técnicas más avanzadas, especialmente de ingeniería genética (animales transgénicos y clónicos), de procedimientos no invasivos (modelos sin letalidad), y de alternativas al uso de animales (cultivos celulares, modelos matemáticos, nanotecnología, simulación médica avanzada) ha permitido que en los últimos años se ha reducido en proporción el número de animales usado en experimentación, y se están utilizando cada vez más animales pequeños (roedores y lagomorfos) en vez de animales grandes.

Diversidad de los modelos animales

Hay más de 4.500 modelos animales descritos en la literatura.

Existen diferencias anatómicas y fisiológicas importantes entre las especies y es importante conocerlas a la hora de elegir la especie que vayamos a utilizar.

APLICACIONES: ELECCIÓN DEL MODELO ANIMAL

Los modelos animales son una aproximación para entender el funcionamiento biológico. Los modelos se deben corresponder con el desarrollo de la enfermedad en humanos (validez), que es el aspecto de mayor importancia en el diseño del estudio.

La extrapolación de los resultados en animales a los humanos, y en concreto a los fetos, neonatos o niños, en pocas ocasiones es directa. A las diferencias propias entre las especies (estructurales y fisiológicas) se añaden las diferencias entre las condiciones del animal de laboratorio y de la vida humana: la homogeneidad genética, ambiental, dietética, etc. La validez de la extrapolación se debe determinar de forma individualizada para cada experimento.

En general, se requiere que exista una analogía en las estructuras (fidelidad), y una similitud de la respuesta. La cercanía en la escala filogenética no implica similitud en la respuesta. Por esta razón, entre otras, se tiende a utilizar los animales en los que existe una amplia documentación sobre su anatomía, fisiología, y respuesta en diferentes experimentos.

TABLA 1. Clasificación de modelos animales.

Tipo	Comentario
Inducido	Las variables a investigar se inducen experimentalmente en animales sanos: asfixia neonatal, diabetes mellitus, shock hemorrágico,...
Modificación genética	Líneas transgénicas de animales con inserciones o deleciones específicas de genes: ratones Knock-out. Empleo de mutágenos (nitrosurea para la hernia diafragmática congénita).
Espontáneos	Selección de animales consanguíneos en los que la variable a investigar aparece por una mutación espontánea: ratón desnudo, ratón enano, ratón obeso, rata hipertensa,...
Negativos	Carencia de reactividad a un estímulo. No desarrollan la enfermedad. Estudio de los mecanismos de resistencia.
Huérfanos	Patologías que no se han observado en humanos y sí en animales. Genera conocimientos útiles previos al descubrimiento de la enfermedad en humanos (encefalopatía espongiiforme bovina).

Clasificación de los modelos animales

Existen varios procesos para desarrollar modelos animales. Los más utilizados son los tres primeros (ver Tabla 1).

Elección de los modelos animales

Como se ha comentado previamente, es una fase muy importante y delicada del estudio. Es preciso revisar de forma extensa la bibliografía existente. Los animales que son mejor conocidos y existe mayor experiencia de uso son los roedores y cobayas.

Se han propuesto varias listas de preguntas que nos pueden ayudar a seleccionar el modelo animal que se adecue mejor a nuestro objetivo de investigación:

1. ¿Merece la pena investigar el problema? Debe ser relevante y tener solución.
2. ¿Ha sido resuelto por alguien? Revisar la bibliografía.
3. ¿Puede desarrollarse en un modelo humano?
4. ¿Sería apropiado un modelo animal? Plantearse alternativas

TABLA 2. Características propias de la etapa infantil.**Características y diferencias respecto de los organismos adultos**

Inmadurez de los sistemas (digestivo, SNC, respiratorio, inmunológico,...)

Características mecánicas de los tejidos

Proporciones somáticas

Adultos: ausencia de crecimiento.

Diferencias en el aprendizaje, conductas.

Tasa metabólica.

5. ¿La especie es apropiada? Revisar anatomía, fisiología, posible extrapolación
6. ¿Existe bibliografía sobre alguna especie NO apropiada? Revisar.
7. ¿Qué conclusiones se pueden obtener de la investigación fallida?
8. ¿Se pueden controlar las variaciones genéticas y ambientales? Homogeneidad.
9. ¿Se puede controlar el estado sanitario? Homogeneidad.
10. ¿Se han considerado otras cuestiones? Logísticas; capacidad del personal; restricciones...
11. ¿Son comparables la fisiología humana y la del animal? ¿Dosis y ruta metabólica?

Indicación del uso de modelos animales en salud materno-infantil

Los datos que se han obtenido en los estudios que han empleado modelos de animales adultos no son extrapolables a la pediatría. Existen importantes diferencias que exigen investigaciones en modelos animales infantiles (ver Tabla 2).

Existen varias áreas en las que la investigación con animales de laboratorio es necesaria: nutrición, farmacología, uso de vacunas, influencia de factores ambientales, estudios de comportamiento, ensayo de técnicas quirúrgicas, evaluación de tecnología sanitaria, o con fines docentes y de entrenamiento.

La salud materno-infantil comprende desde la etapa fetal-gestante, neonatal y pediátrica. Algunos ejemplos de modelos animales en estas diferentes etapas:

- Fetal: estudio de malformaciones, efecto de tóxicos, técnicas de cirugía fetal.
- Neonatal: análisis de la transición de la circulación fetal-extrauterina, inducción de asfisia intraparto, tratamiento del déficit de surfactante,

TABLA 3. Estrategias para un balance ético favorable (estrategia de las tres R de Russell y Burch 1959).

Reemplazar	Por otros modelos (células, tejidos, modelo matemático, etc.).
Reducir	Al máximo el número de animales. Cálculos tamaño muestral.
Refinar	Producir el menor sufrimiento.

efectos del exceso de concentración de oxígeno inspirado durante la reanimación.

- Pediátrico: menos específico que las anteriores.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

El enfoque ético se basa en el análisis del balance entre los beneficios científicos que puede aportar el estudio frente a la pérdida de bienestar que le va a suponer a cada animal que va a participar. El concepto de pérdida de bienestar es muy importante, y no incluye exclusivamente a la percepción de dolor, sino también tiene en cuenta la angustia, las alteraciones del comportamiento y la falta de adaptación al ambiente. La falta de adaptación se puede manifestar de diversas formas: se pueden observar un aumento de la mortalidad no esperado, aparición de lesiones por el ambiente (físico o social), disminución del crecimiento, inhibición de la función reproductora, desarrollo de estereotipias, etc.

Estrategias para conseguir un balance más favorable

Russell y Burch (Principles of Humane Experimental Technique, 1959) describieron la estrategia “de las tres erres” basada en reemplazar, reducir y refinar el modelo animal para optimizar el balance entre el beneficio científico con la menor pérdida de bienestar del animal. (Tabla 3)

La actitud de los miembros del equipo de investigación hacia los animales debe ser de respeto, afecto y gratitud; como si de un miembro más del equipo se tratara.

Comités de ética de experimentación animal (CEEA)

Los CEEA evalúan los proyectos de forma imparcial, correcta y equilibrada para asegurar que se aplican las estrategias que favorecen el balance ético,

TABLA 4. Evaluación de un proyecto con animales de laboratorio.	
Diseño	Número de animales. Duración. Manipulaciones.
Previsión de resultados	Valoración de métodos alternativos. Aplicación de la estrategia de las tres erres.
Idoneidad	Valoración de la idoneidad de la especie para los objetivos y el modelo.
Analgesia. Anestesia	Evaluación de las fases en las que pueda existir pérdida de bienestar. Métodos aplicados.
Finalización	Criterios de finalización. Método.
Personal implicado e instalaciones	Acreditaciones.

y han demostrado ser útiles en la transmisión de las exigencias legales a los investigadores. Para facilitar la comunicación con los investigadores y la agilidad en los procesos burocráticos, las instituciones cuentan con sus propios CEEA en vez de estar centralizado en un nivel superior. La desventaja de esta medida es la existencia de una potencial falta de neutralidad.

Otras funciones son evaluar que el establecimiento donde se van a realizar los estudios cumple con las condiciones ambientales y sanitarias adecuadas, y evaluar los establecimientos de cría registrados.

El personal que maneja a los animales de laboratorio debe estar acreditado. Se distinguen cuatro categorías:

- A. Técnico cuidador. Cuidados de rutina de los animales.
- B. Experimentador. Realiza los procedimientos.
- C. Dirección de los procedimientos. Investigador responsable del diseño.
- D. Experto en ciencias del animal de laboratorio.

Comités de ética de experimentación animal (CEEA)

Los aspectos más relevantes que se evalúan de un proyecto se resumen en la tabla 4.

Legislación

“Protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos”

- RD 1201/2005.
- Ley 32/2007.

- Consejo de Europa (Convenio ETS 123).
- Unión Europea (Directiva 86/609/CEE).

CONCLUSIONES

- La experimentación animal es una herramienta poderosa de conocimiento. Debemos hacer un uso correcto.
- Los modelos animales adultos no son extrapolables a los niños.
- Balance ético: evaluación cuidadosa entre el beneficio y la pérdida de bienestar.
- Favorecer el balance ético: reducir. Reemplazar. Refinar.
- Selección adecuada del modelo. Válido y extrapolable.

BIBLIOGRAFÍA

1. Martín J, Orellana JM, Tur J. Ciencia y tecnología del animal de laboratorio. Ed. Universidad de Alcalá. Sociedad española para las ciencias del animal de laboratorio (SECAL). Madrid, 2011.
2. García M, Caramés J, Gómez JR, et al. Is experimental surgery necessary or essential in the training program of a pediatric surgeon? *Cir Pediatr.* 2011; 24: 221-3.

DISEÑO DE ESTUDIOS

Jose María Bellón Cano

INTRODUCCIÓN

Un objetivo fundamental de la investigación epidemiológica es determinar las causas que determinan la aparición de una enfermedad o evento. En la presencia de una enfermedad intervienen muchas causas o factores, los cuales además interactúan entre sí. Identificar estas causas o combinación de ellas no es nada fácil, ya que una o diferentes causas, pueden producir un mismo evento.

En la planificación de un proyecto de investigación que pueda responder nuestra pregunta de estudio, son muchos los elementos que debemos tener en cuenta. A modo de resumen, podemos enumerar los siguientes:

- Antecedentes y estado actual del tema (justificación del estudio).
- Hipótesis (si las hay).
- Objetivos (generales y específicos).
- Metodología:
 - Diseño del estudio (experimental, observacional).
 - Criterios de inclusión y de exclusión.
 - Sujetos de estudio:
 - Tamaño muestral necesario.
 - Procedimiento de muestreo.
 - Variables de estudio (unidades e instrumentos de medida).
 - Recogida de los datos (tiempo, lugar de recogida, aleatorización, etc.).
 - Análisis estadístico de los datos.
- Limitaciones del estudio.
- Plan de trabajo (etapas de desarrollo y distribución de tareas del equipo investigador).
- Aplicabilidad y utilidad práctica de los resultados.
- Experiencia del equipo y medios disponibles.

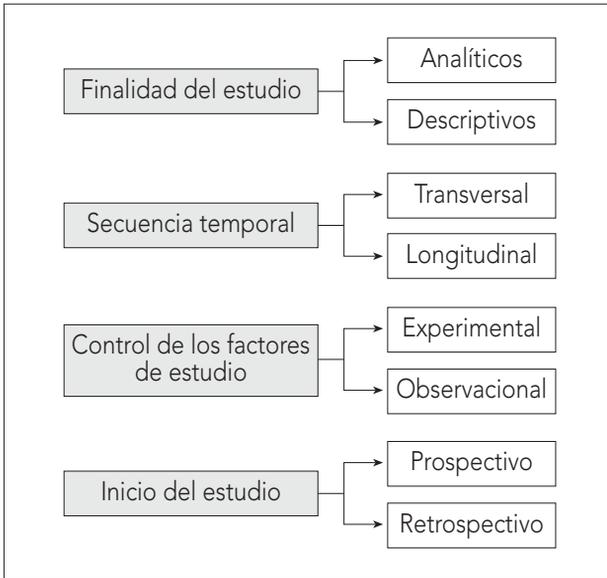


Figura 1. Clasificación de los estudios epidemiológicos.

CLASIFICACIÓN DE LOS ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS

Los estudios epidemiológicos se pueden clasificar de varias formas en función de diferentes criterios. (Fig. 1)

Finalidad del estudio

- **Analíticos:** aquel estudio que pretende evaluar una presunta relación causa-efecto.
- **Descriptivos:** se limitan a describir y valorar los resultados del estudio, sin entrar a estudiar directamente una posible relación causa-efecto.

Secuencia temporal

- **Transversal:** se realiza una única observación por paciente, de modo que se estudian al mismo tiempo tanto la exposición como el evento de interés.
- **Longitudinal:** se realizan al menos dos mediciones en el tiempo por paciente. En este tipo de estudios es posible verificar que la exposición antecede a la ocurrencia del evento.

Salvo algunas excepciones es muy difícil verificar en los estudios transversales si la exposición precede al evento, por lo que se da más valor a los estudios longitudinales.

TABLA 1.

Descriptivo	Analítico	
Observacional	Observacional	Experimental
<ul style="list-style-type: none"> - Un caso o serie de casos - Transversales - Ecológico 	<ul style="list-style-type: none"> - De cohortes - Casos y controles 	<ul style="list-style-type: none"> - Ensayo clínico - Ensayo clínico cuasi experimentales - Ensayo de campo

Control de los factores de estudio

- **Experimental:** el investigador controla la exposición, e incluso es posible utilizar la aleatorización como método de asignación.
- **Observacional:** el investigador, no controla la exposición.
Un estudio experimental es más valorado que uno observacional, ya que el investigador controla tanto la exposición como su grado.

Inicio del estudio

- **Prospectivo:** en el momento de inicio del estudio, aún no se ha producido el evento de interés o enfermedad (variable resultado).
- **Retrospectivo:** el evento de interés, sucede con anterioridad al inicio del estudio.

En general los estudios prospectivos están mejor valorados, ya que la recogida de la información suele ser de mejor calidad al diseñarse el estudio de manera expresa para determinar el evento en cuestión y los factores asociados. También podemos encontrar estudios mixtos, con una parte prospectiva y otra retrospectiva, denominados *ambispectivos*.

Los estudios epidemiológicos pueden incorporar una o varias características anteriormente mencionadas. Por ejemplo un ensayo clínico aleatorizado, considerado como el que mayor evidencia proporciona para determinar una relación causa-efecto, se puede clasificar de la siguiente manera: según su finalidad es *analítico*, por su secuencia temporal es *longitudinal*, cómo se controla el factor de estudio es *experimental*, y además es *prospectivo*. La combinación de estas características, da lugar a los estudios de la tabla 1.

CONCEPTOS ESTADÍSTICOS BÁSICOS

Se puede definir la estadística como la ciencia que se ocupa de clasificar y analizar los datos procedentes de la observación o de la experimentación con

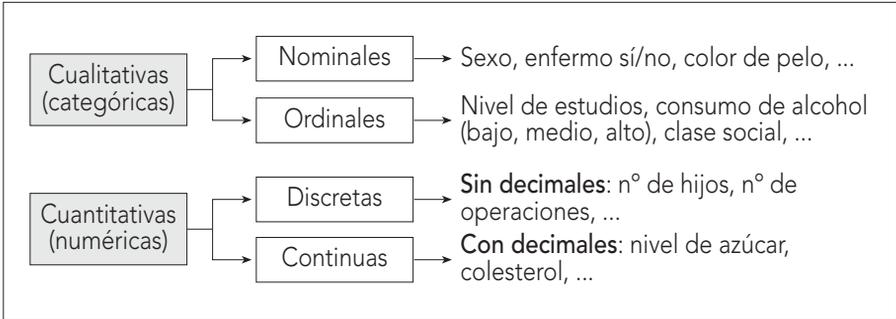


Figura 2. Tipos de variables.

el fin de obtener conclusiones de ellos. En estadística vamos distinguir dos grandes ramas:

- **Estadística descriptiva:** en la que se estudian las técnicas necesarias para la organización, presentación y resumen de los datos obtenidos cuya principal utilidad va a ser resumir la información en unos pocos índices denominados “estadísticos”.
- **Estadística analítica o inferencial:** en la que se estudian las bases lógicas y las técnicas mediante las cuales pueden establecerse conclusiones sobre la población de estudio a partir de los resultados obtenidos en una muestra. Su principal finalidad va a ser la estimación de parámetros y el contraste de hipótesis.

CONCEPTOS GENERALES

Variables

Son propiedades o cualidades que presentan los elementos de una población.

Tipos de variables (Fig. 2)

- **Cualitativas** (categóricas). Este tipo de variables no se pueden medir numéricamente. Se pueden dividir en nominales u ordinales.
- **Cuantitativas** (numéricas). Se pueden dividir a su vez en discretas si solo pueden tomar valores concretos dentro de un intervalo (no pueden tener decimales), o continuas si pueden tomar cualquier valor dentro de un intervalo.

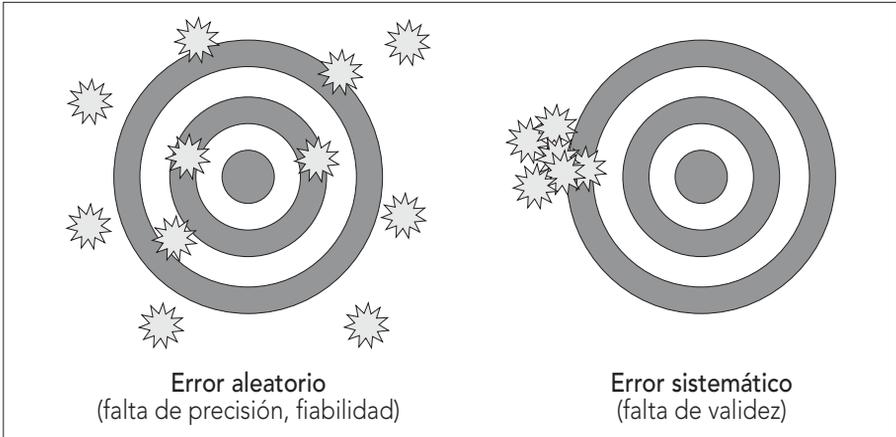


Figura 3. Error aleatorio y error sistemático.

Confundir el tipo de variables con el que se está trabajando, induce a errores muy graves en la aplicación e interpretación de las distintas técnicas estadísticas.

CONCEPTOS BÁSICOS EN EL DISEÑO DE EXPERIMENTOS

- **Variable resultado:** es la variable dependiente, aquella cuyos cambios se desean estudiar.
- **Factor:** es la variable independiente, aquella que manipula el investigador para estudiar sus efectos sobre la variable dependiente.
- **Niveles de un factor:** son cada una de las categorías o valores que puede tomar el factor.
- **Tratamiento:** es cada uno de los niveles de un factor o de las combinaciones de todos los niveles si son varios factores.
- **Unidad experimental:** es el elemento o conjunto de elementos más pequeño expuesto al factor de estudio.
- **Aleatorización:** es un proceso que consiste en aplicar de forma aleatoria los tratamientos a las unidades experimentales.

ERROR SISTEMÁTICO Y ERROR ALEATORIO (Fig. 3)

Toda medición conlleva un error en su proceso. Los errores que podemos cometer en la recogida de los datos se pueden clasificar en errores sistemáticos y aleatorios.

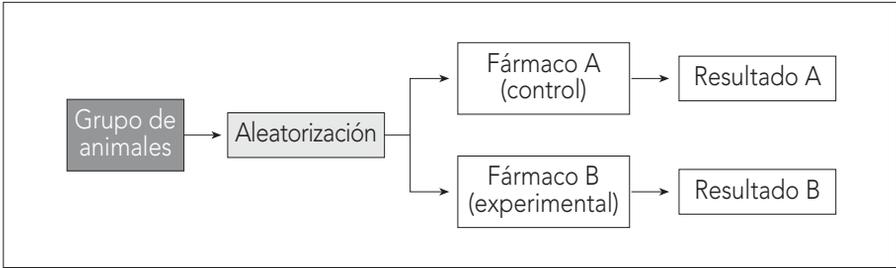


Figura 4. Ejemplo de experimento.

El primero puede estar originado por un defecto en el instrumento de medida o por la forma en la que obtenemos nuestras mediciones.

El segundo, el error aleatorio, no es predecible y es debido al azar. Este error se produce normalmente por errores en la medición y en la variabilidad de las observaciones, y en definitiva, porque trabajamos con una muestra.

El error sistemático es más grave y también más difícil de detectar. Puede ser debido a la elección de una muestra no representativa, mediciones de mala calidad, etc. Este tipo de error nos va a provocar sesgos en los resultados y al mismo tiempo va a afectar a la validez del estudio.

Las fórmulas empleadas en el cálculo del tamaño muestral solo tienen en cuenta el error aleatorio.

El error aleatorio no puede ser eliminado, pero sí reducido con un diseño de estudio más eficiente y aumentando el tamaño muestral. Este tipo de error es estimado y es el que se tiene en cuenta al calcular los intervalos de confianza y al aplicar las pruebas de contraste de hipótesis. Hay que tener en cuenta que el tamaño muestral no reduce el error sistemático. La aleatorización tiende a promediar cualquier efecto sistemático presente entre los grupos o tratamientos, de esta forma, al comparar los 2 grupos solo se medirán los efectos de los tratamientos mismos.

Ejemplo de experimento

Un ejemplo de experimento clásico es el siguiente: Se tiene un grupo de animales y mediante un proceso de aleatorización se asignan a uno u otro fármaco. El factor sería el fármaco, teniendo dos niveles posibles (fármaco A y fármaco B). Cada nivel del factor, determina un tratamiento. Posteriormente se analizan los resultados de cada grupo. (Fig. 4)

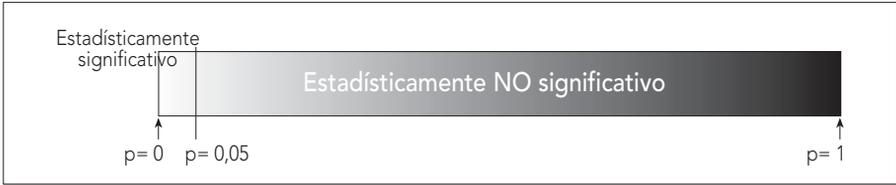


Figura 5. Valor de p.

CLASIFICACIÓN DE LOS MODELOS EXPERIMENTALES

- **Factor de efectos fijos:** es un factor en el que los niveles han sido seleccionados específicamente por el experimentador. Es apropiado cuando se quiere comparar el efecto sobre la respuesta solo de esos niveles específicos.
- **Efectos aleatorios:** los niveles del factor son una muestra de todos los posibles niveles que podrían haberse elegido. Se utilizan cuando se tiene un número muy grande de niveles y no es razonable o posible trabajar con todos ellos. En función de los factores, los modelos experimentales se clasifican en tres tipos:

- De efectos fijos.
- De efectos aleatorios.
- Mixtos (factores fijos y aleatorios).

Ejemplo de modelo experimental de efectos mixtos: Un investigador quiere estudiar la eficacia de 2 compuestos diferentes para el control de la diabetes. Además, para cada compuesto elige 3 dosis distintas (según sus criterios) entre las muchas dosis que podría haber elegido. Estamos ante 6 tratamientos y 2 factores: el primero con 2 niveles (el compuesto: factor fijo) y el segundo con 3 niveles (la dosis: nivel aleatorio).

¿Qué es la p?

La p no es una medida de asociación, es una medida de azar. Podemos definir la "p" como la probabilidad de que las diferencias encontradas puedan ser explicadas por el azar. Este valor p, es el que aparece como resultado de cualquier prueba estadística, ya sea para comparar medias, medir asociación, etc. No hay que olvidar que el valor de p es una probabilidad que va de 0 hasta 1, por tanto es un valor continuo que puede tomar cualquier valor dentro de ese intervalo. Es recomendable mostrar los valores de p con tres decimales. Aunque la conclusión a efectos prácticos pueda ser la misma con una $p=0,051$ que con $p=0,860$, es obvio que las situaciones no son iguales a pesar de que en ambos casos la diferencia "no es estadísticamente significativa". (Fig. 5)

TABLA 2. Pruebas de contraste de hipótesis usadas con mayor frecuencia.

Variable independiente o predictora	Variable dependiente o respuesta	Pruebas empleadas	Observaciones
Categoría	Categoría	Ji-cuadrado Prueba exacta de Fisher Test de McNemar Regresión logística	Muestra grande Muestra pequeña Medidas repetidas Multivariante
Categoría	Cuantitativa	T de Student ANOVA (1 factor) U Mann-Whitney Wilcoxon Kruskall-Wallis Friedman Kaplan-Meier Regresión de Cox	Compara medias 2 grupos Compara medias > 2 grupos 2 grupos, no paramétrico (NP) 2 grupos, medidas repetidas (NP) > 2 grupos (NP) > 2 grupos med rep. (NP) Curvas de supervivencia Multivariante
Cuantitativa	Cuantitativa	Correlación Pearson Correlación Spearman Regresión Regresión múltiple	Paramétrico No paramétrico Paramétrico Multivariante

Si comparamos dos grupos y decimos que no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas, no podemos afirmar que los grupos son iguales.

Siempre que encontremos diferencias o asociación entre variables, debemos valorar la magnitud de esa diferencia o asociación. Estadísticamente significativo no quiere decir necesariamente importante o relevante. Encontrar asociación no indica por sí mismo causalidad. El investigador es el que determina si la diferencia o la asociación encontrada es relevante. Siempre podremos encontrar una *p* significativa aumentando el tamaño muestral a pesar de que la asociación o las diferencias encontradas sean muy pequeñas.

PRUEBAS DE CONTRASTE DE HIPÓTESIS USADAS CON MAYOR FRECUENCIA (Tabla 2)

En función de la naturaleza de las variables y de las hipótesis y objetivos del estudio, tenemos distintas posibilidades para realizar una u otra prueba

estadística. Las pruebas paramétricas se caracterizan porque se basan en la media y en la desviación típica para encontrar diferencias, requiriendo por tanto distribución normal de las variables. Las pruebas no paramétricas pueden utilizarse sin cumplir esta restricción. Cada una de estas pruebas nos dará un valor de "p" y como conclusión de la prueba estadística deberemos aceptar o rechazar la hipótesis nula.

Cómo calcular el tamaño muestral

Uno de los objetivos principales de la estadística es conseguir información a partir de los resultados de una muestra e inferir dichos resultados a la población de la cual procede. Como normalmente es imposible poder estudiar cada uno de los elementos que componen nuestra población de estudio, se elegirá una muestra lo más representativa posible.

No es fácil calcular el número de pacientes que un investigador necesita para responder a su pregunta de estudio, entre otras razones, porque no existe un número único, ya que va a depender de muchos factores.

Las fórmulas para el cálculo del tamaño muestral suelen ser muy complejas, además, hay un gran componente subjetivo en la determinación de cualquier tamaño muestral por lo que debemos tomar los cálculos obtenidos por las fórmulas como valores solamente orientativos. Inevitablemente, el tamaño muestral estará limitado y predeterminado por nuestros recursos materiales. Una adecuada revisión bibliográfica sobre los tamaños muestrales utilizados en estudios similares al nuestro, la propia experiencia y nuestro enfoque personal del problema aplicando el sentido común, pueden ayudar al establecimiento del tamaño muestral.

Habitualmente el investigador tiene en mente el tamaño muestral del que va a disponer, ya que vendrá condicionado por cuestiones de factibilidad y presupuesto. Muchas veces la pregunta del investigador se transforma en esta otra: el tamaño muestral que espero y puedo estudiar ¿va a ser suficiente para responder de forma satisfactoria mi pregunta de estudio y por tanto alcanzar los objetivos de mi investigación?

En los estudios experimentales, se elige una variable resultado principal y a partir de las diferencias que entre grupos se consideren clínicamente importantes, se realizan las estimaciones de tamaño muestral.

La tabla 3 nos serviría para estimar el tamaño muestral necesario para poder comparar 2 proporciones. Supongamos que queremos comparar la eficacia de 2 tratamientos. El grupo 1 recibe el tratamiento tradicional mientras que el grupo 2 recibe un tratamiento experimental. Se espera una tasa de respuesta en el grupo 1 del 30% y se considera clínicamente relevante si la repuesta del

TABLA 3.

		Grupo 2									
		10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%
Grupo 1	10%		199	59	31	19	13	8	7	4	2
	20%	199		294	80	39	23	13	10	7	4
	30%	59	294		356	94	41	23	13	8	5
	40%	31	80	356		388	97	41	23	13	6
	50%	19	39	94	388		388	94	39	19	10
	60%	13	23	41	97	388		356	80	31	13
	70%	8	13	23	41	94	356		294	59	18
	80%	7	10	13	23	39	80	294		199	27
	90%	4	7	8	13	19	31	59	199		54
	100%	2	4	5	6	10	13	18	27	54	

grupo 2 es del 60% o superior. Para este ejemplo se necesitarían 41 pacientes/animales/etc. en cada grupo.

Si lo que queremos es comparar las medias de 2 grupos, debemos establecer previamente una diferencia de medias clínicamente relevante y considerar la dispersión (desviación típica) que esperamos encontrar. Ejemplo: queremos comparar 2 grupos y consideramos como clínicamente relevante una diferencia de 30 unidades entre los grupos. Estimamos una desviación típica de 20 unidades.

El cociente de ambas cantidades es el llamado "tamaño de efecto", en nuestro caso $30/20 = 1,5$. Ayudándonos de la figura 6, podemos estimar un tamaño aproximado de 10 unidades en cada grupo bajo esos supuestos.

PROGRAMAS DE LIBRE DISTRIBUCIÓN PARA CALCULAR TAMAÑOS MUESTRALES

- **Epidat.** Programa de epidemiología muy recomendable. Actualmente (noviembre de 2014) se encuentra disponible la versión 3.1 y la versión 4.1, aunque esta última pendiente del desarrollo de algunos módulos. Este programa también permite la asignación aleatoria de sujetos a tratamientos. Se puede descargar en:
<http://www.paho.org/spanish/sha/epidat.htm>

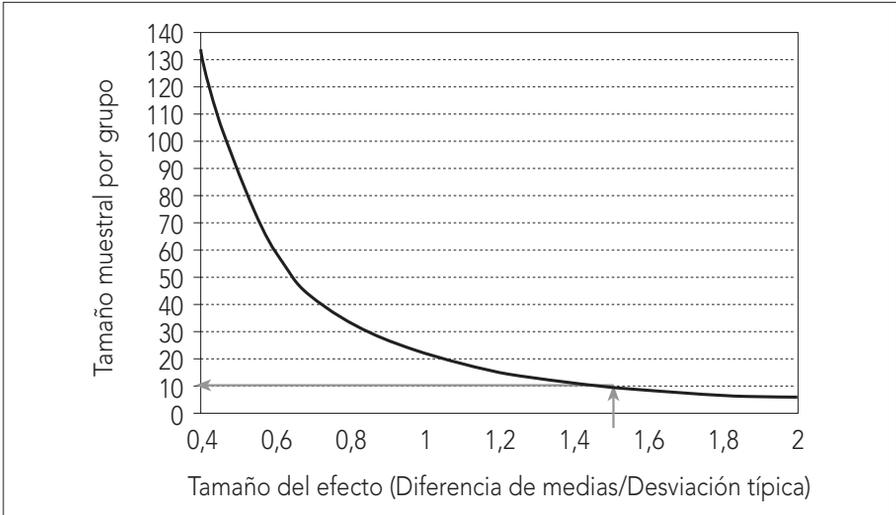


Figura 6.

- **Granmo.** Es un programa on-line muy sencillo de utilizar desarrollado por el Hospital del Mar de Barcelona. Actualmente se encuentra disponible la versión 7.12. y se puede descargar desde:
<http://www.imim.cat/ofertadeserveis/software-public/granmo/>

BIBLIOGRAFÍA

1. De Irala Estévez J, Martínez-González M, Seguí-Gómez M. Diseños de investigación epidemiológica. Epidemiología aplicada. Ed: Ariel Ciencias Médicas; 2005.
2. Doménech Massons JM. Fundamentos de diseño y estadística. Investigación científica: Diseño de estudios. www.metodo.uab.cat. Ed: Signo; 2009.
3. Martínez González MA, Sánchez-Villegas A, Faulín Fajardo FJ. Bioestadística Amigable. 2ª Edición. Ed: Díaz de Santos; 2006.
4. Muñiz-García J, Santiago-Pérez M. ¿Cuántos pacientes selecciono para mi estudio?. Angiología 2006; 58: 145-50.
5. Pita Fernández, S. Determinación del tamaño muestral. Cad Aten Primaria. 1996; 3: 131-40. <http://www.fisterra.com/mbe/investiga/9muestras/9muestras.asp>
6. Silva Ayçaguer LC. El enigma del tamaño muestral. Cultura estadística e investigación científica en el campo de la salud: una mirada crítica. Ed: Díaz de Santos; 1997. p. 285-305.

EXPERIMENTACIÓN ANIMAL EN CIRUGIA PEDIÁTRICA

Leopoldo Martínez Martínez

MODELOS ANIMALES DE ENFERMEDADES QUIRÚRGICAS PEDIÁTRICAS

El uso de animales de experimentación para el estudio de algunas enfermedades quirúrgicas pediátricas nos permite estudiar la etiología y la patogenia de anomalías congénitas complejas lo que, inevitablemente, produce una mejoría en el tratamiento médico y quirúrgico de estas enfermedades.

Aunque no existe un modelo animal para cada una de las enfermedades o anomalías humanas, nadie duda hoy de que los modelos disponibles a día de hoy son de gran importancia para la investigación médica. Nos permiten comprender las bases moleculares y bioquímicas de la enfermedad y facilitan el descubrimiento de nuevos fármacos y modalidades alternativas de tratamiento médico o quirúrgico.

En general, las fases por las que pasa el desarrollo de un modelo experimental de enfermedad humana se pueden resumir en:

1. Intentar reproducir en condiciones controladas la enfermedad o la malformación a estudio.
2. Verificar que se asemeja a la enfermedad humana correspondiente.
3. Estudiar los mecanismos implicados en su patogenia.
4. Intentar corregirla o mejorarla.
5. Trasladar lo aprendido en el laboratorio a la clínica.

Debido a su disponibilidad, los animales pequeños como los roedores son los preferidos por la comunidad científica. Los ratones y las ratas tienen múltiples ventajas, lo que les ha hecho líderes en la investigación quirúrgica pediátrica. Sin embargo, existen otros modelos animales de los que daremos a continuación algunas reseñas.

MODELOS CON EMBRIÓN DE POLLO

El embrión de pollo o de codorniz ofrece unas oportunidades inigualables para el estudio de determinadas malformaciones congénitas quirúrgicas. Debido

a la disposición del embrión dentro del huevo, es sencillo manipularlo en condiciones de laboratorio de forma que se puede abordar en distintas fases del desarrollo y seguir, hasta el momento que se desee, la evolución de la malformación creada. El embrión es accesible a través de una pequeña cámara aérea residual que se encuentra por encima de la vesícula alantoidea. Desde ahí y con ayuda de un microscopio es posible manipular el embrión y crear así el modelo deseado. La fácil disponibilidad de huevos fecundados y la facilidad de incubación, así como la sencilla planificación de los tiempos necesarios y la poca necesidad de espacio útil para hacerlo, hacen que este modelo sea una alternativa real para muchos equipos. Tiene la ventaja añadida de que no es necesario disponer de titulación de manipulador de animales de ningún tipo para realizarlo.

En nuestra experiencia contamos con modelos experimentales realizados con este animal para:

- Atresia intestinal, mediante la coagulación con pinza bipolar de un asa intestinal en fases tempranas del desarrollo.
- Gastrosquisis, de forma similar, dejando una abertura en la pared abdominal. Permite el estudio histológico del intestino expuesto a la cavidad amniótica y la cuantificación de reactantes inflamatorios, por ejemplo.
- Onfalocèle, mediante la administración de Cadmio en el interior del huevo.
- Espina bífida mediante la aspiración de cierta cantidad de albúmina de dentro del huevo.

MODELOS CON RATA

La rata ofrece ventajas innegables para el estudio experimental de determinadas malformaciones o enfermedades. Su uso universal favorece la disponibilidad de reactivos, anticuerpos, material de laboratorio específico, estudios genéticos,... específicos. A continuación detallamos tres ejemplos de enfermedades quirúrgicas pediátricas que pueden estudiarse en condiciones de laboratorio con este animal.

Hernia diafragmática congénita

Desde la década de los 80 se sabe que la administración de un herbicida llamado Nitrofen a las ratas gestantes produce en la descendencia una alta tasa de fetos con hernia diafragmática congénita.

El Nitrofen es un herbicida prohibido en los países desarrollados que altera de alguna forma el normal desarrollo del diafragma en los fetos de rata cuando

se administra vía oral a la madre entre el noveno y décimo día de gestación. Lo más relevante de este modelo es que no solo reproduce la malformación en sí, es decir, el defecto diafragmático, sino que también sufren los fetos todo el cortejo malformativo que en el humano suele acompañarlo.

Por este motivo es un excelente modelo para el estudio de la hipoplasia pulmonar, las malformaciones cardíacas, vertebrales, costales, traqueales, tónicas, craneofaciales o intestinales que suelen estar asociadas a la hernia en el humano.

Su mecanismo de acción parece estar relacionado con el metabolismo del ácido retinoico. La inhibición de una de las enzimas intracitoplasmáticas que se encargan de metabolizarlo parece el paso clave para que se desencadene una malfunción de los genes activados por el retinoico.

Atresia de esófago

La administración intraperitoneal durante cuatro días seguidos a la rata gestante produce, en la descendencia, una alta tasa de fetos con atresia de esófago. Este modelo, inicialmente descrito y desarrollado en el Hospital Infantil La Paz, ha servido para el estudio de la malformación y del cortejo acompañante que caracteriza a la asociación VACTER, pues además del defecto esofágico, los fetos de rata muestran también alteraciones cardíacas, pulmonares, esqueléticas o craneofaciales.

Reflujo gastroesofágico

La rata adulta provee también de un buen modelo experimental para el estudio de la barrera anti-reflujo de la unión esófago gástrica. La facilidad para el estudio funcional mediante el uso de aparatos de manometría en retirada y la posibilidad de manipular quirúrgicamente tanto el esófago como el diafragma, han hecho de este modelo un buen ejemplo de posibilidad de traslación de hallazgos del laboratorio a la clínica.

LOS MODELOS EXPERIMENTALES CON ROEDORES: VENTAJAS E INCONVENIENTES

Como decíamos anteriormente, la rata y el ratón son los mamíferos más universalmente utilizados en experimentación animal. Su uso está tan extendido que la contribución al progreso de la ciencia debida a ellos es incontable. Innumerables premios Nobel se han entregado a científicos que han experimentado con ellos. Las ventajas teóricas son cada vez mayores, pues también es mayor el conocimiento de su fisiología, su genética o su embriología. Ello

hace que la disponibilidad de material para su uso en condiciones de laboratorio sea infinita.

A la hora de iniciar nuestro modelo experimental habrá que plantearse, sin embargo, si el ratón o la rata son el mejor modelo para la enfermedad que queremos estudiar. También si los resultados que obtengamos serán útiles o válidos para su aplicación en clínica. Y, en caso contrario, si podemos encontrar otro modelo experimental o mejorar uno existente para hacerlo.

No se debe olvidar nunca que al igual que un humano no es representativo de toda la humanidad, una cepa de ratones o de ratas no es representativa de todos los rodeos y, mucho menos, de los humanos. Por eso la información que nos ofrecen los modelos es útil siempre que no olvidemos que son simplemente eso, modelos. Sin embargo seguimos dependiendo de los animales para el estudio de muchas facetas de la enfermedad, pues existen barreras éticas y limitaciones prácticas infranqueables que no permiten estos estudios directamente en humanos.

Es necesario recordar que mientras que Fleming descubrió el papel de la penicilina sin investigar en animales, Florey y Chain, con quienes compartió el Nobel, probaron en ratones que se podía usar para tratar infecciones sistémicas.

Estudios genéticos y embriológicos

Los roedores son los mejores animales para el estudio del desarrollo de los mamíferos. Tienen gestaciones muy productivas y frecuentes, cuentan con un genoma totalmente secuenciado y manipulable y se dispone de un número enorme de cepas distintas puras para su uso en laboratorios. El 99% de los genes del ratón tienen su equivalente humano, por lo que son ideales para el estudio de su función. Se pueden además crear ratones transgénicos (con genes adicionales) y también ratones *knock-out* (a los que les faltan una o las dos copias de un gen determinado). Estas manipulaciones los hacen ser un buen modelo para el estudio por ejemplo de algunos oncogenes o de genes relacionados con enfermedades musculares genéticas. Sin embargo, la expresión de los genes es dependiente de otros muchos "residentes" que pueden modular de una manera u otra su expresión. Además, todo este proceso es caro y no siempre posible.

Desde el punto de vista embriológico, el desarrollo del ratón es muy corto. En apenas 18 días se pasa de la fecundación al parto. Ofrece la posibilidad de manipular embriones en fases muy precoces de la división, obteniendo incluso "quimeras", es decir, embriones con células provenientes de otro embrión diferente. Sin embargo estas manipulaciones son complejas y no siempre tienen éxito.

Estudios en neurociencias

Los genes responsables del desarrollo y la función cerebral en el ratón y en el humano son idénticos en un 90%, lo que significa que el cerebro del ratón puede ser un arma muy potente para el estudio de enfermedades mentales o de fenómenos como la inteligencia o la memoria. Anatómicamente, el cerebro del ratón es más liso que el del humano y contiene un menor porcentaje de células gliales, a las que se supone un papel importante en determinados procesos mentales complejos. El ratón es útil en este campo para el estudio de fenómenos como el hambre, la ansiedad, el ritmo circadiano, el autismo o el síndrome de alcohol fetal. Pero no lo es para procesos que requieren tener autoconciencia, autoreflexión o consideración y tampoco para estudios de depresión, autoestima, tendencia al suicidio y, en menor medida, para enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson o el Alzheimer.

Estudios en cáncer

Los avances en el tratamiento del cáncer se deben en gran parte al uso de roedores como animales de experimentación. El implante ortotópico o heterotópico o la implantación de células cancerosas en el pulmón mediante la inyección a través de la vena de la cola, son técnicas que se usan a diario en todo el mundo.

EUTANASIA EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

El sacrificio de los animales de experimentación es una consecuencia inevitable de su uso. El respeto a todo ser vivo debe caracterizar esta práctica, que tiene una regulación legal estricta sujeta a normativas de carácter supraestatal como las Directivas del Consejo Europeo 86/609 o la 93/119.

Existen muchos motivos por los que sacrificar a los animales con los que experimentamos. Los más frecuentes son:

- Se ha llegado al final del experimento.
- Se han derivado efectos adversos indeseables no esperados.
- Para obtener sangre o tejidos.
- Si los niveles de dolor, angustia o sufrimiento sobrepasan lo previsto.
- Si ya no son aptos para la cría.
- Porque los animales no van a ser utilizados o tienen características no adecuadas para el experimento.

En todos los casos los procedimientos de eutanasia buscan disminuir el dolor y la angustia de los animales. El dolor puede definirse como una experiencia

sensorial aversiva que produce acciones motoras protectoras, dando como resultado el aprendizaje para evitarlo y que puede modificar rasgos de conducta específicos de especie, incluyendo la conducta social. El dolor implica siempre un conocimiento consciente de los estímulos y no una respuesta inconsciente a los mismos. Son signos de dolor y angustia por ejemplo las vocalizaciones, la lucha, los intentos de huida, las agresiones defensivas, la micción o la defecación, el temblor y otros espasmos... Cualquier método de eutanasia debe evitar todos ellos.

MÉTODOS ACEPTABLES DE EUTANASIA

Métodos físicos

- Disparo, en la cabeza, para reptiles y grandes mamíferos.
- Concusión o aturdimiento por golpe, en animales pequeños
- Aturdimiento eléctrico, que se usa en peces, anfibios, aves o cerdos.
- La dislocación cervical, que es más aceptable si existe sedación previa.
- Decapitación, usando una guillotina especial.
- Maceración, en pollitos de hasta 72 h de vida
- El microondas, no el de uso doméstico sino uno específico.

Métodos químicos inhalatorios

- Dióxido de carbono, que es muy eficaz y humanitario a concentraciones altas.
- Monóxido de carbono, que produce una muerte muy rápida y sin angustia pero que es muy peligroso para el operador.
- Anestésicos inhalatorios como el halotano, el isoflurano.

Agentes inyectables

Persiguen una anestesia antes de aplicar un bloqueante neuromuscular. El más usado universalmente es el pentobarbital sódico. Existen preparados que mezclan anestésico loco, hipnótico y curarizante todo en uno como el T-61.

Métodos aceptables en animales inconscientes

Algunos ejemplos son la inserción de una aguja en la base del cerebro, la ultracongelación rápida en nitrógeno líquido, el etanol intraperitoneal, el etanol, el cloruro potásico, el propofol, la exanguinación o la embolia gaseosa.

Métodos inaceptables de eutanasia

Lo son por ejemplo la descompresión, el vacío, la hipo o hipertermia, el ahogamiento, la rotura de cuello, el estrangulamiento, el protóxido de nitrógeno, el éter o el cloroformo. Todos ellos no están aceptados para su uso en animales de experimentación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mortell A, et al. Animal models in pediatric surgery. *Pediatr Surg Int.* 2006; 22: 111-28.
2. Lopez de Torre B, et al. Transperitoneal exchanges of water and solutes in the fetus with gastroschisis. Experimental study in the chick embryo. *Eur J Pediatr Surg.* 1991; 1: 346-52.
3. Doi T, et al. Downregulation of ROCK-I and ROCK-II gene expression in the cadmium-induced ventral body wall defect chick model. *Pediatr Surg Int.* 2008; 24: 1297-301.
4. Lopez de Torre B, et al. Spina bifida: a chick embryo experimental model. *Z Kinderchir.* 1990; 45(Suppl 1): 20-2.
5. Tovar JA. Congenital diaphragmatic hernia. *Orphanet J Rare Dis.* 2012; 7: 1.
6. Greer JJ, et al. Etiology of congenital diaphragmatic hernia: the retinoid hypothesis. *Pediatr Res.* 2003; 53: 726-30.
7. Tovar JA. Stephen L. Gans Distinguished Overseas Lecture. The neural crest in pediatric surgery. *J Pediatr Surg.* 2007; 42: 915-26.
8. Diez-Pardo JA, et al. A new rodent experimental model of esophageal atresia and tracheoesophageal fistula: preliminary report. *J Pediatr Surg.* 1996; 31: 498-502.
9. Fragoso AC, et al. Abnormal Sonic hedgehog signaling in the lung of rats with esophageal atresia induced by adriamycin. *Pediatr Res.* 2014; 76: 355-62.
10. Millar AJ, et al. An adriamycin experimental rat model inducing a wide variety of abnormalities similar to VACTERL association in humans is now well established. *Pediatr Surg Int.* 2001; 17: 502.
11. Montedonico S, et al. Gastroesophageal reflux after combined lower esophageal sphincter and diaphragmatic crural sling inactivation in the rat. *Dig Dis Sci.* 1999; 44: 2283-9.
12. Montedonico S, et al. Muscular architecture and manometric image of gastroesophageal barrier in the rat. *Dig Dis Sci.* 1999; 44: 2449-55.
13. Soto C, et al. Identification of diaphragmatic crural component of gastroesophageal barrier in the rat. *Dig Dis Sci.* 1997; 42: 2420-5.

14. Close B, et al. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. DGXI of the European Commission. *Lab anim.* 1996; 30: 293-316.
15. Close B, et al. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. DGXT of the European Commission. *Lab anim.* 1997; 31: 1-32.

MODELOS ANIMALES EN NEONATOLOGÍA

Victoria Mielgo Turuelo, M^a del Carmen Rey Santano

INTRODUCCIÓN

Los modelos animales bien aplicados permiten, no solo avanzar en el conocimiento, sino también desarrollar mejores métodos de diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades, es decir, permiten caracterizar y entender mejor una patología, así como la respuesta a un fármaco tanto a nivel de eficacia como de seguridad. A nivel neonatal, el uso específico de modelos animales neonatales permite el estudio del efecto de diferentes fármacos sobre los órganos y sistemas inmaduros en desarrollo.

Los modelos animales poseen una serie de ventajas, pero también limitaciones. Entre las ventajas cabe destacar que son sistemas más simples, debido a que el ambiente es fácilmente controlable lo que va a permitir mantener las variables experimentales. Además permiten aislar específicamente acciones sobre el órgano diana sin olvidar al organismo en su conjunto y, por tanto, el efecto sobre otros órganos y sistemas. Del mismo modo, permiten llevar a cabo procedimientos que no son posibles en humanos, un ejemplo de ello es el uso de métodos invasivos de monitorización, así como la obtención de muestras diferentes para la realización de análisis moleculares, celulares y/o histológicos, lo que permite un estudio más en profundidad de una enfermedad y los efectos de un tratamiento determinado. Finalmente, destacar que permiten tiempos de generación más cortos y que poseen ciclos de vida más cortos.

La mayor limitación es que aunque los modelos animales pueden asemejar una patología humana, siempre existen diferencias anatómicas, fisiológicas o de regulación génica que hay que tener en cuenta a la hora de extrapolar los datos a la población humana. Para minimizar este hecho, hay que elegir el modelo más adecuado teniendo en cuenta la finalidad del estudio, además de hacer una revisión sistemática de los estudios existentes en la literatura sobre la patología y/o tratamiento estudiados.

Los requerimientos necesarios para elegir un modelo adecuado son: análoga maduración del órgano de estudio, tamaño adecuado, daño reproducible y lesión producida directamente por el daño, anestesia, fácil disponibilidad y mantenimiento y coste razonable.

En neonatología, al igual que en la mayoría de las áreas de investigación en biomedicina, los modelos más usados son los roedores. Sin embargo, existen modelos, como el de cordero prematuro y el de cerdo neonatal, que debido a su tamaño y accesibilidad resultan muy útiles en el estudio de determinadas patologías.

MODELO DE CORDERO PREMATURO

El cordero prematuro es un modelo muy empleado para el estudio de la fisiopatología fetal-neonatal ya que la estructura y fisiología pulmonar y cardiaca ofrecen similitudes con el hombre, además tiene un tamaño adecuado que permite la instrumentalización y monitorización posterior y la toma periódica de muestras, estando la anatomía de la oveja muy bien estudiada. Todas estas ventajas harían que este modelo fuera óptimo en la investigación de enfermedades respiratorias. La mayor desventaja se debe a que, como es necesario realizar una cesárea a ovejas preñadas a una edad gestacional conocida, se necesita de personal entrenado y de medios e infraestructuras adecuados para la realización del mismo, esto hace que sea un modelo costoso. Además, es importante conocer las características propias de la raza (Latxa, Merina, etc.) con la que se va a trabajar, ya que se ha observado cierto grado de variación en la madurez pulmonar en función de la edad gestacional entre razas.

Modelos experimentales

Tal y como se ha mencionado con anterioridad el modelo de cordero resulta ser un modelo adecuado en el estudio de la patología respiratoria neonatal. De esta manera el cordero se ha empleado, entre otros para el estudio de:

- Síndrome de dificultad respiratoria neonatal: el cordero prematuro ha sido ampliamente usado para el estudio de esta enfermedad debido a las similitudes fisiológicas y patológicas que se producen con el niño prematuro. La edad gestacional y la raza determinan el grado de severidad, por lo que son dos factores a tener en cuenta a la hora de estudiar la patología, su tratamiento y la extrapolación de los datos al humano.
- Asfisia perinatal: el modelo de cordero pretérmino ha sido muy utilizado a lo largo de los años para el estudio de esta patología ya que proporciona

un buen acceso a los cambios fisiológicos que surgen en el útero durante el evento antenatal. El modelo consiste en la oclusión total o parcial del cordón umbilical durante un tiempo variable en función del grado de daño que se pretende provocar. En este caso, a la hora de extrapolar los datos se debe tener en cuenta la edad gestacional empleada y el grado de madurez, ya que se sabe que a término el cerebro del cordero es más maduro que el del humano.

- Síndrome de aspiración meconial: en este caso se utilizan corderos neonatales de 4 días de edad a los que se les instila endotraquealmente meconio para producir la patología, de forma que se puede estudiar la fisiopatología y el efecto de diferentes tratamientos.

MODELO DE CERDO NEONATAL

El cerdo recién nacido tiene un desarrollo similar a un feto humano de 36 a 38 semanas. Su tamaño al nacimiento (1,5 a 2 kg) permite una mayor instrumentación y monitorización de diferentes variables fisiológicas tanto de forma invasiva como no invasiva además del seguimiento del animal, controlando así diversas variables y parámetros fisiológicos que dan una visión más generalizadas del progreso de una patología específica o de un determinado tratamiento. También permite la extracción de diferentes muestras biológicas que permiten un estudio bioquímico e histológico que en muchos casos ayuda a entender la patología. Además posee características anatómicas y fisiológicas similares al humano, incluyendo los sistemas cardiovascular, urinario y digestivo entre otros. Las principales desventajas es que es un modelo que requiere de tiempo y entrenamiento para conseguir la instrumentación adecuada, además de espacio adecuado para llevar a cabo los procedimientos.

Muchos son los protocolos anestésicos usados en el modelo de cerdo neonatal. Lo principal a tener en cuenta cuando se pretende elegir el régimen anestésico es, por un lado asegurar que el animal no sufre dolor ni stress durante el procedimiento experimental y por el otro que no exista una interferencia en el procedimiento experimental y sus efectos adversos potenciales en los resultados científicos.

Modelos experimentales

El modelo de cerdo neonatal ha sido y esta siendo utilizado para el estudio de diversas patologías que afectan a los neonatos. Algunos modelos que podemos destacar son:

- Hipoxia-isquemia neonatal: el daño se produce mediante la reducción de la FiO_2 al 8-10% y la oclusión temporal de las carótidas durante un periodo de tiempo que varía entre 20-30 min. Este modelo no solo permite avanzar en el estudio de la lesión que se produce a nivel cerebral, sino también estudiar el efecto sobre otros órganos, como el pulmón, los riñones, el hígado, ... Además del estudio del efecto de la administración de diferentes tratamientos (ej. hipotermia, endocannabinoides, melatonina, xenón, etc.)
- Modelaje farmacocinético/farmacodinámico: además de poseer características anatómicas y fisiológicas similares al humano, también existen similitudes en las enzimas que metabolizan fármacos, lo que sugieren que los cerdos pueden ser un modelo animal adecuado para el estudio de biotransformación de fármacos (ej. fentanilo).
- Estudio de fármacos inotrópicos/vasoactivos: un modelo usado en este área consiste en someter a los cerdos neonatales a una hipoxia prolongada de 2 horas a FiO_2 de 10-15%, lo que provoca complicaciones cardiovasculares (descenso del gasto cardiaco, tensión arterial, ...), entre otras. Este modelo permite el estudio del efecto, no solo a nivel cardiovascular sino también renal, pulmonar, cerebral..., de diferentes drogas cardiovasculares (ej. vasopresina, dobutamina).

MONITORIZACIÓN DE ANIMALES PREMATUROS Y NEONATOS

La monitorización de las constantes vitales es un factor clave en el seguimiento del estado clínico del paciente crítico aunque el nivel de gravedad de la enfermedad que queramos investigar nos obligará a una monitorización más o menos cruenta (invasiva vs. no invasiva).

Monitorización no invasiva

La monitorización no invasiva es la medida de constantes vitales u otros parámetros sin invasión de los tejidos. El control clínico del modelo animal en estado crítico se basa primordialmente en la evaluación directa y continua, y exige una monitorización de los principales constantes vitales, como son la frecuencia cardíaca (FC), la frecuencia respiratoria (FR), la presión arterial (PA), la saturación de oxígeno ($SatO_2$) y la temperatura corporal periférica (T^a). Otros parámetros que se pueden medir de forma no invasiva son la hemodinámica cerebral mediante NIRS (espectroscopia cercana al infrarrojo) y la función cerebral mediante electroencefalografía (EEG), entre otras.

- Frecuencia cardíaca: son los latidos del corazón por minuto. Se colocan electrodos adhesivos en el tórax, se conectan al cable y este al monitor con electrocardiografía (ECG). Se obtiene una monitorización continua, el cual nos dará un dato numérico (FC) y una curva con las ondas P, complejo QRS y T.
- Frecuencia respiratoria: son los movimientos respiratorios. Se contabiliza de forma manual y aislada contando los ciclos respiratorios producidos en un minuto, o de forma continua por medio de un monitor que nos ofrecerá un dato numérico y una onda que nos indicará el tipo de respiración, mediante la colocación de electrodos adhesivos en el tórax.
- Presión arterial: es la presión ejercida por la sangre a su paso por las paredes arteriales. Está determinada por el gasto cardíaco y la resistencia vascular periférica, por ello refleja tanto el volumen de eyección de la sangre como la elasticidad de las paredes arteriales. Se puede medir de forma intermitente mediante manguitos neumáticos adaptados al tamaño y edad del animal, estos se sitúan en una de las extremidades y se conectaran a un equipo oscilométrico el cual nos dará el resultado de la presión arterial media.
- Temperatura: es el equilibrio entre la producción de calor por el cuerpo y su pérdida. La obtención de la temperatura periférica se realizará mediante un electrodo que detecta la temperatura de la piel. La temperatura es un factor importante en la hemodinamia ya que según su valor se activarán mecanismos para promover la producción de calor (vasoconstricción, aumento del metabolismo) o para promover la pérdida de calor (vasodilatación, hiperventilación y sudoración). Se debe tener en cuenta la susceptibilidad de los animales prematuros y neonatos a las variaciones de temperatura ambiental, por la inmadurez del centro termorregulador y la falta de grasa subcutánea.
- Saturación de oxígeno o pulsioximetría: mide la saturación de la sangre a través de la piel. Se obtiene mediante un sensor, colocado en una de las extremidades del animal utilizado, que posee un emisor de luz y un fotodetector; la intensidad y color de la luz que atraviesa la piel y los tejidos es medida por el detector y lo transfiere al monitor que nos indica la intensidad del pulso arterial, la saturación de hemoglobina y la frecuencia cardíaca. La medición se realiza de forma continua e incruenta.
- Hemodinámica cerebral mediante NIRS: permite monitorizar de forma continua la concentración de la oxihemoglobina, deoxihemoglobina,

hemoglobina total y la citocromo aa3, permitiendo cuantificaciones absolutas del flujo sanguíneo cerebral, volumen sanguíneo cerebral y cesión de O₂ a los tejidos. Se presenta como una alternativa atractiva para la monitorización neonatal, dado que es una técnica no invasiva, absolutamente inocua y de fácil aplicabilidad mediante la colocación de un electrodo adhesivo, pudiéndose utilizar de forma continua.

- Electroencefalografía (EEG): es una técnica neurofisiológica que permite el registro de la actividad eléctrica cerebral. El EEG utilizado en animales prematuros o neonatos es uno de los pocos métodos objetivos que explora la integridad funcional de la corteza cerebral inmadura y sus conexiones y se convierte en una poderosa herramienta para el conocimiento clínico del desarrollo cerebral en el periodo neonatal.

Monitorización invasiva

La monitorización hemodinámica invasiva permite valorar de forma continua el estado fisiológico e identificar un deterioro agudo para realizar un tratamiento adecuado de forma precoz. Se obtienen parámetros de presiones, morfología de ondas, saturaciones de oxígeno de vasos y cavidades cardíacas que son de gran importancia para el diagnóstico, evolución, pronóstico y tratamiento.

- Presión arterial: la medición de la presión arterial también se puede realizar de forma continua e invasiva mediante catéteres arteriales conectados a un sensor de monitorización y a un sistema de transcripción de presiones, en este caso nos ofrecerá una curva y el dato numérico de presiones (sistólica, diastólica y media). Es de gran utilidad para efectuar las frecuentes extracciones analíticas y para la monitorización continua de la presión arterial.
- Presión venosa central (PVC): su extremo distal suele alojarse en la aurícula derecha, canalizándose de forma percutánea la vía venosa yugular interna o la vía venosa femoral. Este tipo de ubicación da valiosa información sobre las presiones de llenado del lado derecho e, indirectamente, sobre el estado del gasto cardíaco mediante la saturación venosa de O₂. Es la vía de elección para la perfusión de sustancias vasoactivas y otros agentes farmacológicos.
- Catéter de Swan-Ganz: se emplea para la monitorización constante de las presiones que soporta la circulación pulmonar mediante la cateterización de la arteria pulmonar y nos permite obtener los siguientes parámetros:
 - Presión venosa central (PVC).

- Presión capilar pulmonar de enclavamiento: es equivalente a la presión auricular izquierda.
 - Volumen minuto: al monitorizar el cambio de temperatura de la sangre después de haberse inyectado un bolo de una solución a menor temperatura que la sangre.
 - Saturación mixta de oxígeno venoso: puede medirse continuamente o usando una muestra sanguínea obtenida del orificio distal del catéter.
 - Índice cardíaco: es el volumen minuto promedio dividido por la superficie corporal.
 - Índice de volumen sistólico: es el volumen eyectado en cada sístole.
 - Índice de trabajo sistólico del ventrículo izquierdo: Es el trabajo realizado por el ventrículo para eyectar el volumen sistólico hacia la aorta.
 - Índice de transporte de oxígeno: es la cantidad de O_2 enviada a los capilares por minuto.
 - Consumo de oxígeno: es la cantidad de O_2 tomada por los capilares por minuto.
- Sistema PICCO: cada día cobran más importancia las mediciones continuas basadas en la termodilución transpulmonar y el análisis de la onda de la presión arterial (PiCCO), que con una vía central y un catéter especial en la arteria femoral, nos informa de la fracción de acortamiento ventricular, las resistencias, el volumen latido y el volumen total intratorácico de sangre, el agua pulmonar extravascular, etc.
- Mecánica pulmonar: la ventilación mecánica se emplea frecuentemente en modelos experimentales con el objetivo de ofrecer soporte ventilatorio al neonato/prematuro con insuficiencia respiratoria. La monitorización de las propiedades mecánicas (tanto estáticas como dinámicas) del aparato respiratorio es imprescindible para el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad respiratoria. Los parámetros a evaluar son:
- Volumen corriente (VT): volumen de gas movilizado en cada ciclo respiratorio.
 - Volumen del espacio muerto (VD): volumen de gas movilizado en cada ciclo, pero que no realiza intercambio gaseoso, debido a que no tiene contacto alveolar.
 - Volumen minuto (Vm): es el producto del VT menos el volumen del espacio muerto (VD) por la frecuencia respiratoria (FR).
 - Complianza o distensibilidad (CL): elasticidad o adaptabilidad del tejido pulmonar, expresada como cambios de volumen producidos por los cambios de presión determinados.

- Resistencia del sistema respiratorio (R): se refiere a la dificultad que encuentra el gas al pasar por la vía respiratoria.
- Curvas presión-tiempo; flujo-tiempo; flujo-volumen; volumen-presión.

RECOGIDA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS EN ANIMALES PREMATUROS Y NEONATOS

Una de las limitaciones que puede tener el trabajar con modelos prematuros o neonatos es el tamaño/peso del animal, no solo por el hecho de tener que monitorizar y cateterizar vías en animales de pequeño tamaño, sino a la hora de obtener los diferentes tipos de muestras biológicas necesarios para llevar a cabo o completar nuestros estudios. Es por ello, que previamente a la recogida de muestras hay que pensar muy bien que tipo de muestras (sangre, líquido cefalorraquídeo, orina, etc.), volumen, cada cuanto tiempo y que parámetros vamos a estudiar en ellas.

Muestras sanguíneas

En la práctica clínica la sangre es la muestra biológica más solicitada para el análisis por la gran cantidad de información que ofrece sobre la enfermedad a estudiar.

En sangre arterial se emplea para realizar gasometrías arteriales, que tiene como objetivo medir los parámetros sanguíneos y gases (pH, presión de O₂, presión de CO₂, concentración de ion bicarbonato, saturación de O₂ y exceso de bases). Estos parámetros sirven para valorar el estado respiratorio del paciente, así como el estado de los órganos reguladores del organismo como los pulmones o los riñones y el equilibrio ácido-base.

En la sangre venosa se pueden hacer diversos y diferentes estudios analíticos, ya sean desde el punto de vista bioquímico, hematológico y/o microbiológico, dependiendo de la patología que estemos estudiando.

Líquido cefalorraquídeo (LCR)

Cuando se estudia una enfermedad que afecte al sistema nervioso central y periférico donde se liberan sustancias o células anormales en el LCR, la obtención de unas gotas nos permite estudiar estas estructuras y obtener información muy valiosa sobre la patología de estudio. En el LCR se pueden llevar a cabo estudios macroscópicos, conteo de células, cultivo, estudios bioquímicos con determinación de proteínas totales, cloruros y glutamina, estudio de hongos, serología infecciosa, citología, inmunofijación.

Orina

La orina es uno de los fluidos resultantes del metabolismo y su análisis aporta mucha información de forma rápida y económica. Su obtención es relativamente fácil, y es muy útil en el diagnóstico de la enfermedad renal y del tracto urinario y en la detección de enfermedades metabólicas o sistémicas no relacionadas directamente con el sistema urinario.

Tejidos

Teniendo en cuenta la patología de estudio, se obtendrán y evaluarán uno o varios tejidos en los que se pueden realizar pruebas morfológicas (tinción hematoxilina-eosina, inmunohistoquímicas, Tunnel), valoración anatomopatológica (necrosis, apoptosis, edema, hemorragia intersticial, etc.), pruebas bioquímicas (test mediante técnica de Elisa para inflamación, estrés oxidativo, etc.), estudios moleculares (extracción de RNA, secuenciación), cultivo celular de los diferentes tejidos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gastiasoro E, Alvarez FJ, Rey-Santano C, et al. Acute and sustained effects of lucinactant vs. poractant-alpha on pulmonary gas exchange and mechanics in premature lambs with respiratory distress syndrome. *Pediatrics*. 2006; 117: 295-303.
2. Rey-Santano C, Mielgo V, Gastiasoro E, et al. Early cerebral hemodynamic, metabolic, and histological changes in hypoxic-ischemic fetal lambs during postnatal life. *Front Neurosci*. 2011; 5: 111.
3. Rey-Santano C, Mielgo V, Gastiasoro E, et al. Comparative effects of bronchoalveolar lavage with saline, surfactant, or perfluorocarbon in experimental meconium aspiration syndrome. *Pediatr Crit Care Med*. 2012; 13: e187-194.
4. Alvarez FJ, Lafuente H, Rey-Santano MC, et al. Neuroprotective effects of the nonpsychoactive cannabinoid cannabidiol in hypoxic-ischemic newborn piglets. *Pediatr Res*. 2008; 64: 653-8.
5. Rey-Santano C, Mielgo V, Valls-I-Soler A, et al. Evaluation of fentanyl disposition and effects in newborn piglets as an experimental model for human neonates. *PLoS One*. 2014; 9: e90728.
6. Al-Salam Z, Johnson S, Abozaid S, et al. The hemodynamic effects of dobutamine during reoxygenation after hypoxia: a dose-response study in newborn pigs. *Shock*. 2007; 28: 317-25.

MODELOS ANIMALES PEDIÁTRICOS EN CERDOS

Jesús López-Herce Cid

INTRODUCCIÓN

Los modelos animales son sistemas experimentales muy útiles tanto para la formación en determinadas técnicas y procedimientos en los que no se puede realizar directamente el entrenamiento en humanos como para la investigación inicial de múltiples fármacos y técnicas en los que es imprescindible comprobar su eficacia y seguridad.

Los modelos animales deben ser similares en tamaño y/o fisiología al modelo humano. Hace más de un siglo y medio, en 1865 Claude Bernard afirmaba "El éxito de la investigación depende frecuentemente de la elección adecuada del animal para el experimento". Sin embargo, hay que tener en cuenta que, por muy perfecto que sea el modelo animal, nunca reproduce exactamente lo que ocurre en el organismo humano. Por esa razón, los modelos animales solo sirven como un primer paso para evaluar la posibilidad de realizar estudios clínicos.

Los objetivos de este capítulo son explicar las posibilidades del cerdo para la experimentación animal pediátrica, sus características, ventajas, limitaciones, indicaciones y algunas técnicas para su manejo instrumental.

CARACTERÍSTICAS DEL CERDO COMO MODELO ANIMAL

Las características más importantes del cerdo como modelo animal son:

- **Anatomía y fisiología cardiovascular similar al humano.** Por una parte el crecimiento del sistema corazón y de los vasos desde el nacimiento hasta los 4 meses es similar al de los humanos hasta la mitad de la adolescencia. Además la fisiología cardíaca es similar a la humana

- **Respiratorio.** La fisiología respiratoria es similar a la humana.
- **Hígado.** Las características del hígado son similares a las del hombre.
- **Temperatura.** La temperatura normal del cerdo es superior a la humana. La temperatura rectal normal es 38,5-39°C.
- **Gestación, crecimiento y longevidad.** La gestación dura 114 días. El cerdo alcanza la madurez sexual a los 5 a 8 meses. Su vida media es de 10 a 20 años.

Tipos de cerdos

Existen dos tipos de cerdos que se pueden utilizar para experimentación animal pediátrica: los cerdos comunes y los cerdos enanos especiales.

- **Cerdos comunes:** existen 8 razas de cerdos en occidente: Berkshire (negra con puntos blancos), Yorkshire (Blanca Grande), Chester blanca, Duroc (roja), Hampshire (negra con un cinturón blanco), Poland China (negra con puntos blancos) y Spotted (negra con puntos blancos), Landrace (grande, largo y blanco), y cerdo ibérico. Las ventajas de los cerdos comunes es que son baratos y fáciles de conseguir. Los inconvenientes para la experimentación pediátrica es que son de mayor tamaño y, por tanto, menos parecidos a los niños.
- **Cerdos enanos:** los cerdos enanos especiales son más parecidos a los niños en tamaño (alcanzan un peso de 50 a 60 kg cuando son adultos) y algunos son genéticamente idénticos, lo que es importante para algunos experimentos. Sin embargo, son más caros y difíciles de conseguir. Uno de los más utilizados son los "minipigs" (<http://minipigs.com>).

VENTAJAS DEL CERDO COMO MODELO ANIMAL INFANTIL

Las principales ventajas del cerdo como modelo animal infantil son:

- La fisiología y el tamaño del cerdo es similar a las del niño.
- La instrumentación y técnicas quirúrgicas son similares en el cerdo y en el niño. En el cerdo se pueden realizar técnicas y procedimientos que no son posibles con otras especies.
- El genoma del cerdo es similar al del humano.
- El cerdo es más barato y éticamente es más aceptable para la experimentación animal que los primates.
- Debido a su tamaño similar al del niño permite la posibilidad de extracción de múltiples muestras biológicas (sangre, LCR, orina) y de muestras tisulares por biopsia o postmortem.

INCONVENIENTES Y LIMITACIONES DEL CERDO COMO MODELO ANIMAL INFANTIL

Las principales limitaciones para utilizar el cerdo como modelo animal en experimentación pediátrica son:

- Es más caro que los animales pequeños como las ratas y ratones.
- Es relativamente grande y necesita una estabulación especial y un quirófano de animales intermedios, que no están disponibles en todos los laboratorios.
- Su tamaño también dificulta en ocasiones la utilización de algunos medios diagnósticos como la resonancia magnética y la tomografía por emisión de positrones.
- Tiempo: en general los experimentos requieren una duración prolongada.
- Longevidad: es difícil de hacer estudios de seguimiento a largo plazo debido a que tiene una vida media larga.
- La embriología, anatomía y fisiología de los cerdos no se parecen totalmente a la de los humanos y por tanto la enfermedad no siempre es fácilmente reproducible.

INDICACIONES DEL CERDO COMO MODELO ANIMAL EN PEDIATRÍA

El cerdo tiene múltiples indicaciones en investigación y docencia en Pediatría. Las más frecuentes son:

Investigación

- Evaluación y comparación de tratamientos de riesgo que no pueden probarse directamente en humanos. Esto es aplicable a muchos tratamientos utilizados en neonatología, urgencias y cuidados intensivos,
- Estudios farmacocinéticos y farmacodinámica. La mayoría de los estudios de farmacocinética y farmacodinamia de los nuevos fármacos se realizan en voluntarios humanos adultos. Por cuestiones éticas no deben realizarse estudios en niños sanos. Por ese motivo es importante desarrollar modelos animales infantiles que simulen la farmacocinética en niños para reducir el número de niños necesarios en los estudios clínicos.
- Toxicología. Los modelos animales son fundamentales para estudios de seguridad de fármacos y tóxicos.
- Evaluación de tecnología diagnóstica en modelos pediátricos. La mayoría de la tecnología se diseña para el adulto y no se ha comprobado su utilidad y seguridad en niños. Cuando estas técnicas son invasivas es fundamental comprobar su utilidad y comparar su efectividad con las técnicas de referencia en animales, antes de valorar su aplicación en niños.

Docencia

Los modelos animales pueden servir para el aprendizaje y entrenamiento, tanto de técnicas y modelos quirúrgicos como de otros procedimientos médicos

- Aprendizaje de técnicas y modelos quirúrgicos y no quirúrgicos. Los modelos animales son muy útiles para el desarrollo y entrenamiento de nuevas técnicas quirúrgicas como por ejemplo las laparoscopias, endoscopias, canalización de vías centrales o colocación de drenajes guiados por ecografía, la implantación de dispositivos.
- Cursos de formación. Además de los cursos específicos de formación en investigación, los modelos animales también son útiles en cursos de formación en los que hay que aprender a utilizar técnicas invasivas en situaciones agudas similares a la clínica humana en niños, como por ejemplo en los cursos de ECMO (oxigenación por membrana extracorpórea), ventilación mecánica, trauma o técnicas de depuración extrarrenal.

MODELOS DE ENFERMEDADES PEDIÁTRICAS CON CERDOS

Las enfermedades en pediátricas en las que más frecuentemente se utiliza el cerdo como modelo experimental son:

- Enfermedades cardiovasculares.
- Shock.
- Parada cardíaca.
- Daño cerebral.
- Patología respiratoria.
- Efecto de la ventilación mecánica y pruebas de función respiratoria.
- Patología hepática.

También se utilizan, aunque con menor frecuencia, en:

- Obesidad. Nutrición enteral y parenteral.
- Infecciones y desarrollo de vacunas.
- Enfermedades tumorales.
- Quemaduras, cicatrización, de la piel.

Ejemplos de modelos de experimentación con cerdos

Algunos modelos en patología aguda pediátrica son:

- Modelo de shock hemorrágico: con hemorragia controlada (mediante la extracción de un volumen de sangre determinado a través de un catéter) o no controlada (mediante laceración hepática o esplénica).

- Modelo de shock séptico: mediante la inyección de endotoxinas o la ligadura del ciego.
- Modelo de parada cardiaca: mediante la inducción con catéter de una fibrilación ventricular o la asfixia mediante la inducción de anestesia y paralización muscular.
- Daño pulmonar agudo: mediante lavado pulmonar con detergente o administración de un inhibidor de de surfactante.

CUIDADOS PREOPERATORIOS Y POSTOPERATORIOS

Los cuidados pre y post operatorios son esenciales tanto para asegurar el bienestar del animal, como para conseguir unos resultados fiables, al evitar los sesgos producidos por las alteraciones en el medio ambiente y el estado físico del animal.

Estabulación y ayuno

Es necesario que el cerdo esté estabulado en el laboratorio donde se realizará el experimento al menos durante 24 horas y que mantenga un ayuno de 6 a 8 horas. En los cerdos pequeños si se van a realizar intervenciones prolongadas hay que vigilar la aparición de hipoglucemia.

Premedicación

Aunque existen distintas pautas de premedicación una de las más utilizadas es la administración de ketamina 15 mg/kg/im y atropina 0,02 mg/kg/im.

Sedoanalgesia durante el experimento

En los procedimientos dolorosos y/o invasivos es necesario intubar al animal y mantener una sedación continua.

En general las dosis necesarias de fármacos sedoanalgésicos en el cerdo son más elevadas que en el niño.

- Inducción anestésica: los fármacos más utilizados para realizar la inducción anestésica son el propofol: 5 mg/kg/iv, fentanilo 5 mc/kg/iv y atracurio 0,5 mg/kg/iv.
- Mantenimiento de sedoanalgesia: las dosis para el mantenimiento de la sedación son: propofol 10-12 mg/kg/h, fentanilo 10 µg/kg/h y atracurio 2 mg/kg/h.
- Para anestesia inhalatoria se pueden utilizar el halotano, isoflurano, sevoflurano y el óxido nitroso.

TÉCNICAS INSTRUMENTALES EN EL CERDO COMO MODELO ANIMAL INFANTIL

A continuación se refiere la lista de algunas técnicas que se suelen requerir en los modelos experimentales de cerdo pediátrico (la mayoría de estas técnicas se realizarán durante el curso y la demostración está en el video de la práctica)

- Canalización venosa: oreja.
- Monitorización ECG y saturación.
- Sedación, ventilación e intubación.
- Canalización venosa central y arterial: percutánea-disección.
- Ventilación mecánica: monitorización respiratoria.
- Monitorización de BIS y saturación cerebral.
- Colocación de sonda orogástrica.
- Medición de gasto cardiaco.
- Valoración ecográfica de flujos vasculares.
- Punción pleural: derrame pleural y neumotórax.
- Disección y monitorización del flujo sanguíneo carotídeo y/o renal.
- Talla vesical.
- Punción peritoneal.
- Punción intraósea.
- Reanimación cardiopulmonar.

TÉCNICA DE EUTANASIA

En el capítulo de modelos quirúrgicos se revisan las diferentes técnicas de eutanasia que pueden utilizarse en animales. En la práctica en los modelos animales con cerdo pediátrico la técnica más utilizada es la combinación de un fármaco anestésico a dosis elevadas, combinada con la inducción de una parada cardiaca por administración de un bolo intravenoso rápido de cloruro potásico. Este método tiene la ventaja de ser rápido, incruento y asegurar el bienestar del animal durante el procedimiento. Por otra puede servir como método docente para explicar los riesgos de la administración rápida de potasio y las arritmias secundarias (fibrilación ventricular y asistolia).

Las dosis utilizadas para la eutanasia son:

1. Propofol: 10-20 mg/kg/iv rápido.
2. Cloruro potásico 20 mEq (10 ml de CLK 2M)/iv rápido.

CONCLUSIONES

El cerdo es un buen modelo animal para investigación pediátrica, ya que la fisiología y posibilidad de instrumentación son similares a las del niño. Puede en la investigación en muchas patologías y procesos, el estudio de fármacos, pruebas diagnósticas y terapéuticas, así como para la docencia y entrenamiento. Sus mayores inconvenientes es que requiere instalaciones especiales y es relativamente caro.

BIBLIOGRAFÍA

1. Palazuelos JCM. Modelo porcino en formación e investigación quirúrgica. Disponible en: www.biocat.cat/sites/default/files/111013_Jose_Manuel_Palazuelos.pdf
2. Cruz JI, González A, Burzaco O. Avances en analgesia y anestesia del cerdo. Disponible en: www.consultavet.org/pdf/anestesia-cerdo.pdf
3. Meurens F, Summerfield A, Nauwynck H, et al. The pig: a model for human infectious diseases. *Trends Microbiol.* 2012; 50: 50-7.
4. Heras M. Oveja y cerdo como modelos en la investigación biomédica. Departamento de Patología Animal. Universidad de Zaragoza. Disponible en: www.seapcongresos.com/2011/SEAP/20.../Marcelo_de_las_Heras.pdf
5. Puiman P, Stoll B. Animal models to study neonatal nutrition in humans. *Curr Opin Clin Nutr.* 2008; 11: 601-6.
6. Clutton RE, Reed F, Eddleston M, et al. Prolonged anaesthesia in minipigs. Disponible en: http://minipigs.dk/uploads/media/Prolonged_anaesthesia_in_minipigs.pdf
7. Laredo Alvarez FG. Anestesia en suidos y animales de laboratorio. Universidad de Murcia. Disponible en: ocw.um.es/.../anestesia.../tema-17-anestesia-en-cerdo-y-animales-de-laboratorio.pdf
8. Pehböck D, Dietrich H, Klima G, et al. Anesthesia in swine : Optimizing a laboratory model to optimize translational research. *Anaesthesist.* 2015; 64: 65-70.
9. Geovanini GR, Pinna FR, Prado FA, Tamaki WT, Marques E. Standardization of anesthesia in swine for experimental cardiovascular surgeries. *Rev Bras Anesthesiol.* 2008; 58: 363-70.
10. Baroux D, Chalkias A, Syggelou A, et al. Research in human resuscitation: what we learn from animals. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012; 25(Suppl 5): 44-6.

MODELOS ANIMALES EN PEZ CEBRA

Javier Joya Cecilia

EXPLICACIÓN DEL MODELO

De entre los modelos biológicos más lejanos al ser humano se encuentra el pez tropical *Danio rerio*, o vulgarmente llamado pez cebra. El pez cebra fue descubierto en 1822 por Hamilton y es originario del sudeste asiático. Tradicionalmente tan solo se le consideró como una mascota popular más. Su uso en investigación biomédica se incrementó de manera sustancial hace aproximadamente unos diez años, en el momento en que se pudo conocer el genoma de este animal.

En los últimos años, el pez cebra se ha convertido en un modelo inigualable para investigar diferentes procesos biológicos. Años de investigación han puesto de manifiesto una sorprendente semejanza en la mayoría de procesos biológicos fundamentales entre el pez cebra y el humano. Por lo tanto, esta elevada semejanza implica que las proteínas que controlan estos procesos biológicos sean muy similares. Por esta razón, dentro de un contexto estrictamente biológico, lo que es cierto para el pez cebra lo es también para el ser humano. Por lo tanto, ante este grado de conservación biológica, el pez cebra, lejanamente emparentado con el ser humano, sirve como modelo para identificar agentes causantes de enfermedades hereditarias y/o de exposición a ciertos contaminantes durante el desarrollo embrionario.

Características fundamentales del pez cebra

El embrión de pez cebra no llega a medir más de 1 mm, mientras que el adulto mide entre 3-4 centímetros. Precisamente, su pequeño tamaño es una de las ventajas para los laboratorios de investigación, ya que se pueden tener mayor cantidad de animales en menos espacio y su mantenimiento es relativamente barato (entre 100 y 1.000 veces menos que el coste de mantenimiento de ratones de laboratorio). Además, gracias a su tamaño, machos y hembras son fácilmente identificables (Fig. 1).

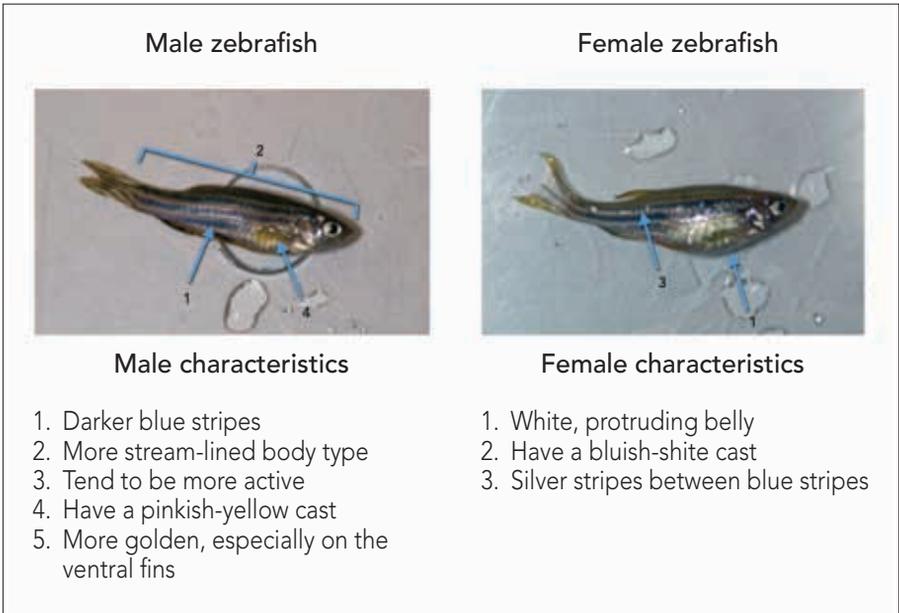


Figura 1. Características esenciales de machos y hembras de pez cebra.

Una característica fundamental del pez cebra es que los embriones son transparentes. Esta característica facilita la identificación del órgano afectado por la generación de mutaciones. La escala en que se han llevado a cabo cribados en el pez cebra es sorprendente. Mediante ese método se han encontrado en los últimos diez años más de mil mutaciones que afectan al desarrollo de órganos, a su funcionamiento o a lo uno y lo otro.

Otra característica que explica el éxito del pez cebra como modelo biológico es el uso que se le da para estudiar el desarrollo temprano en vertebrados. Por ejemplo, tiene un tiempo aproximado de generación de tres meses y los adultos se mantienen fértiles durante más de doce. Esto significa que se puede tener un suministro constante de embriones a un costo relativamente bajo, comparado con otros vertebrados. Además, la fecundación de los huevos y el desarrollo del embrión se llevan a cabo fuera de la hembra, condición que facilita el estudio directo de las etapas tempranas de la ontogenia.

Otra de las ventajas de este modelo es que habitualmente se suelen obtener entre 200 a 500 embriones por pareja a la semana. La organogénesis ocurre en 24 horas, todo un milagro si lo comparamos con el desarrollo embrionario

La tasa de reproducción elevada, el bajo coste de mantenimiento y desarrollo del embrión fuera del cuerpo materno son algunos de los atractivos del pez cebra

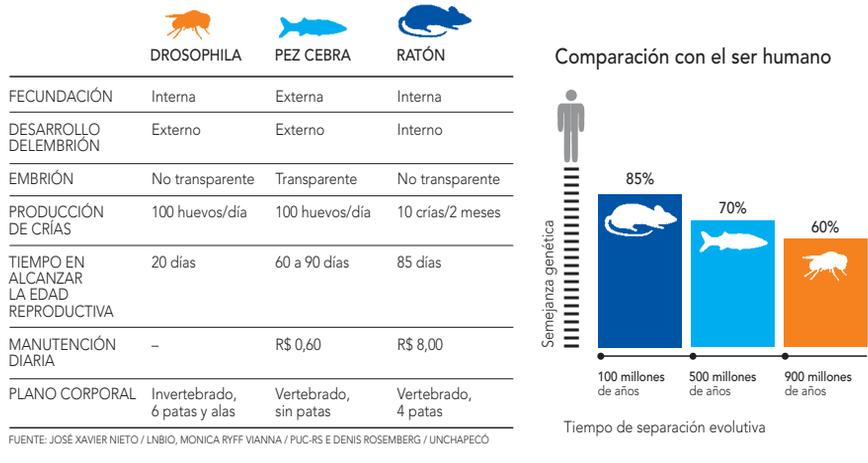


Figura 2. Principales generalidades del modelo de pez cebra respecto a otros modelos.

humano, donde después de 22 horas tras la fecundación solo se ha producido una división celular y cinco días después de la fecundación es un blastocisto con aproximadamente 200 células multipotentes.

Las ventajas que estas características innatas ofrecen para la investigación básica se ven favorecidas por el creciente número de técnicas celulares y moleculares que se han desarrollado alrededor de este modelo biológico.

Las principales ventajas del modelo de pez cebra respecto a otros modelos empleados en biomedicina quedan resumidas en la figura 2.

Características específicas para el empleo del pez cebra

Los estudios pioneros de George Streisinger a finales de los años setenta sentaron las bases para su posterior uso como modelo biológico. Tanto el pez cebra como el ser humano son organismos diploides. Una copia es aportada por la madre y otra por el padre. Gracias a las características anteriormente mencionadas (corto periodo entre generaciones, gran cantidad de embriones obtenidos por semana, tamaño reducido de los adultos y desarrollo externo) se han reducido las restricciones para poder realizar mutagénesis a gran escala en vertebrados.

- Uno de los procesos en que el pez cebra y el ser humano comparten muchas homologías es el cáncer. La mayoría de genes están conservados y además están alterados de una forma similar. Esta semejanza no solo ocurre a nivel molecular sino que también ocurre a nivel histopatológico; las neoplasias de los peces son bastante similares al cáncer en humanos. El pez cebra no es un buen modelo para el estudio de todos los tipos de tumores, ya que no tiene tejido mamario, y tiene branquias en lugar de pulmones. Pero, aunque el pez cebra no pueda ser un modelo directo para el cáncer de determinados tipos de tumores, el mecanismo molecular que lo produce se conserva en otros tumores.
- Fácil manipulación genética: para que un organismo pueda ser un modelo para el estudio de una enfermedad, es necesario que se puedan manipular y alterar los genes implicados en esa enfermedad. La investigación viene aplicando una amplia diversidad de metodologías que permiten la manipulación de la función génica en el pez cebra con una excelente resolución espacial y temporal. Por ejemplo, la transparencia del embrión ha permitido el desarrollo de técnicas no invasoras de observación basadas en proteínas fluorescentes como la proteína fluorescente verde (GFP, de Green Fluorescent Protein). Tales macromoléculas emiten un haz de luz que permite percibir los más íntimos detalles de las células que las portan, en vivo y en directo.
Por otro lado y gracias a su rápida organogénesis y angiogénesis se pueden realizar estudios transitorios introduciendo fácilmente (por microinyección) mRNA o DNA en embriones de pez cebra antes de las primeras divisiones, con lo que se consigue que las células del embrión fabriquen la proteína correspondiente. De manera opuesta, también se pueden reducir los niveles normales de producción de proteínas, por ejemplo utilizando morfolinós (que son oligonucleótidos modificados que se unen al mRNA) y evitan la síntesis de la proteína (Fig. 3).
- Otra de las características fundamentales del pez cebra es su transparencia. Gracias a ello ha permitido identificar la dinámica de expresión de genes diana in vivo por medio de la transgénesis. Por transgénesis se entiende la capacidad de introducir genes y sus regiones reguladoras dentro del genoma. Este procedimiento permite controlar la función génica y observar el momento y lugar en que se activan los genes diana. No solo se pueden identificar grupos de células por medio de la transgénesis, sino también órganos e incluso procesos fisiológicos, como la actividad neuronal.

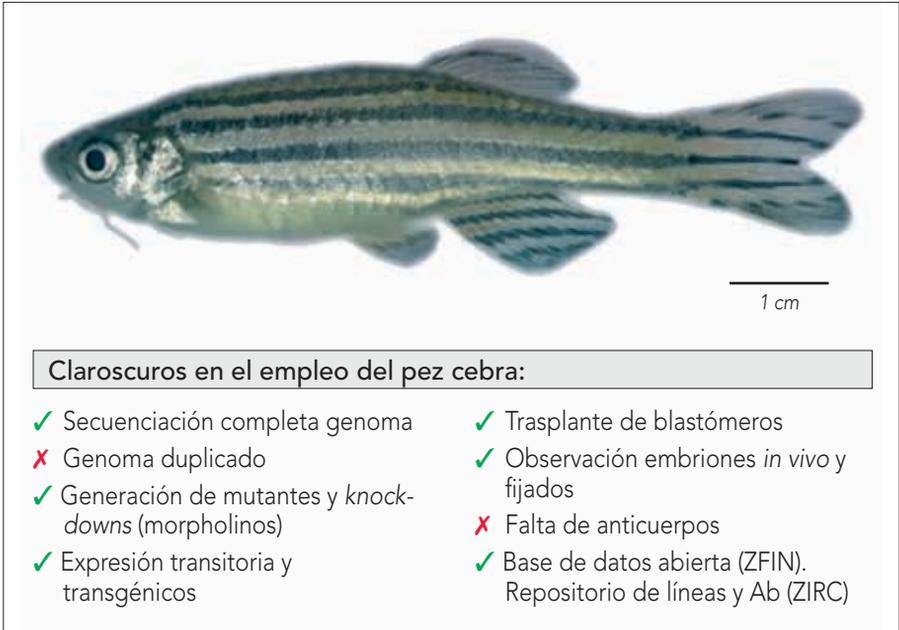


Figura 3. Características específicas para generar modelos para el estudio de enfermedades.

APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DEL EMPLEO DE PEZ CEBRA

Las mismas características que han hecho del pez cebra una herramienta de gran valor para estudiar la biología del desarrollo, se aprovechan para el descubrimiento de nuevos medicamentos.

Gracias al número de su descendencia y su tamaño (1 mm) se pueden hacer experimentos a gran escala, lo que es impensable en vertebrados, lo que junto con el uso de marcadores fluorescentes, han llevado a utilizar los peces transparentes con el escrutinio a gran escala.

Es importante decir que no cabe pensar en una aproximación similar con roedores, cuyo desarrollo ocurre dentro del útero y tiene una descendencia limitada en embriones. Además, los resultados obtenidos de cultivos celulares, se resienten de la falta de contexto, tanto en lo que se refiere al tipo de tejido como a la fase del desarrollo. Además la mayoría de líneas celulares cuentan con mutaciones con lo que no se parte de unas condiciones nativas u óptimas para los ensayos.

Por otro lado, también es muy interesante el hecho en que existe un gran ahorro en el volumen de compuestos químicos ya que varias larvas pueden vivir

en un mismo volumen de líquido en el tamaño de una gota de agua, por lo cual tan solo se requieren cantidades mínimas de los compuestos por ensayo.

El pez cebra también ha comenzado a ganar terreno en biotecnología. En ese dominio, se han diseñado algunas variantes que emiten luz en la oscuridad y pueden usarse como biosensores, ya que emiten luz únicamente cuando se encuentran en un medio muy contaminado por metales pesados y otros desechos industriales. Varios problemas de salud en humanos, entre ellos la esterilidad y el cáncer, guardan relación con la exposición a este tipo de compuestos.

Habida cuenta de la preocupación por los efectos de la contaminación del medio y sus consecuencias en el ser humano, cabe pensar que el número y diversidad de biosensores generados a partir del pez cebra se multiplicarán en los próximos años. Por otra parte, adultos o embriones utilizados como biorreactores podrían ofrecer a la industria una nueva forma de producir a gran escala proteínas que requieran una maduración compleja.

CONCLUSIONES

El pez cebra se utilizó inicialmente como una herramienta para estudiar el desarrollo de los órganos en vertebrados. Después, su abanico de ventajas experimentales lo han convertido en una herramienta biomédica y biotecnológica de gran valor. En ambos casos, el alto grado de semejanza genética y fisiológica con el ser humano es de gran importancia.

La clave de su éxito se debe a la posibilidad de realizar experimentos a gran escala, ya que permite generar plataformas encaminadas al análisis sistemático de compuestos químicos con potencial terapéutico. Así, se han identificado nuevos genes y compuestos químicos que regulan la proliferación descontrolada de células, una esperanza de tratamiento para las personas con cáncer. Asimismo, se buscan nuevos blancos terapéuticos por medio del uso sistemático de morfolinos y cribados genéticos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Keating MT. Genetic approaches to disease and regeneration. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2004; 59: 795-8.
2. Love DR, Pichler FB, Dodd A, et al. Technology for high-throughput screens: the present and future using zebrafish. *Curr Opin Biotechnol.* 2004; 15: 564-71.
3. Zon LI, Peterson RT. In vivo drug discovery in zebrafish. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4: 35-44.

RECOGIDA, PROCESAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

Justo Javier Escobar Cubiella

Como se ha comentado en anteriores capítulos, el diseño experimental es imprescindible para el desarrollo de cualquier estudio o proyecto de experimentación. Tener claro el problema clínico que se quiere investigar, cual puede ser el mejor modelo animal o celular para nuestro estudio y que grupos experimentales se necesitarán incluir en el mismo serán aspectos de suma importancia y vitales para el desarrollo del estudio. Sin embargo, otro aspecto importante y que a veces no es tenido tan en cuenta en muchos estudios experimentales clínicos es la planificación de la recogida de muestras y el correcto procesamiento y almacenamiento de las mismas.

PLANIFICACIÓN DE LA TOMA DE MUESTRAS.

Durante la planificación del estudio conviene realizar una revisión bibliográfica extensa, no solo sobre la fisiopatología que se quiere investigar y los órganos diana a estudiar sino que también conviene informarse apropiadamente sobre las características estructurales y funcionales de esos u otros órganos o fluidos biológicos así como de los abordajes histológicos, bioquímicos y analíticos idóneos para el estudio y la preparación más adecuada de las muestras. Por ejemplo, en el caso de el órgano diana sea el cerebro hay que contar con su alto contenido lipídico a la hora del procesamiento de la muestra, y también tener claras las zonas del mismo que se van a estudiar (ej: córtex, sustancia blanca, hipocampo, cerebelo, etc.). Un tejido complicado para su manejo puede ser el páncreas debido a un elevado contenido de proteasas, peptidasas y ribonucleasas entre otras enzimas. En su procesamiento, las muestras de páncreas pueden precisar de requerimientos y cuidados especiales para evitar la degradación de proteínas, ARN, ADN u otros metabolitos que posteriormente pueden dar lugar al fallo o a la aparición de artefactos en las determinaciones. En el caso de utilizar sangre se ha de tener en cuenta si las determinaciones se realizarán

a partir de sangre total, plasma, suero o de la fracción celular, en fresco o de muestra congelada. En cuanto a las determinaciones, el procesamiento de la muestra será diferente dependiendo de si se quiere realizar un análisis histológico o inmunohistoquímico (puede requerir de una fijación previa del tejido con paraformaldehído), un análisis de la expresión génica (puede requerir la inmersión del tejido en una solución de estabilización y preservación del ARN) o de la expresión proteica (puede requerir la adicción de agentes reductores en el tampón de homogenización). Por ejemplo, la evaluación el estado oxidativo mediante la determinación de los niveles de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) en sangre total por espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida (LC-MS/MS), requiere de la adicción de un bloqueante del grupo tiol (-SH) como la iodoacetamida (IOA) o la N-etilmaleimida (NEM) que se unen covalentemente al -SH previniendo la formación de puentes disulfuros y la auto-oxidación del GSH a GSSG. A pesar de todo, siempre existirá la posibilidad de sorpresas inesperadas y de que no se puedan realizar ciertos análisis, pero por lo menos cuanto más controlados se tengan los aspectos mencionados anteriormente más se reducirá dicha posibilidad.

Por otro lado, a veces también ocurre que por intentar aprovechar al máximo los órganos y tejidos de los animales intervenidos durante el procedimiento animal, se recoge un mayor número de muestras de las necesarias, las cuales serán almacenadas posteriormente a -80°C muchas veces sin saber muy bien para que servirán, ocupando un espacio valioso en el ultracongelador (en este capítulo la mayoría de las veces cuando se hable del almacenamiento de las muestras se referirá principalmente a la ultracongelación de las mismas a -80°C). Además, el excesivo llenado del ultracongelador puede generar un almacenamiento caótico de las muestras que puede ser contraproducente para el estudio y que puede retrasar y/o dificultar la realización de numerosas determinaciones.

MINIMIZACIÓN DEL RIESGO DE ERRORES Y ACCIDENTES.

Ningún estudio de experimentación clínica queda exento de poder sufrir accidentes más o menos catastróficos, fruto de negligencias o casualidades que puedan conducir al fracaso o al retraso del mismo. Por ejemplo, que una persona tenga un tropiezo cuando lleva unas muestras y pueda perder alguna de ellas al recogerlas, o que un ultracongelador se estropee en fin de semana o en vacaciones con muestras valiosas dentro son hechos que por desgracia ocurren habitualmente. No obstante, siempre y cuando esos hechos sean detectados, al menos se podrá poner remedio o incluso interrumpir el estudio a tiempo si

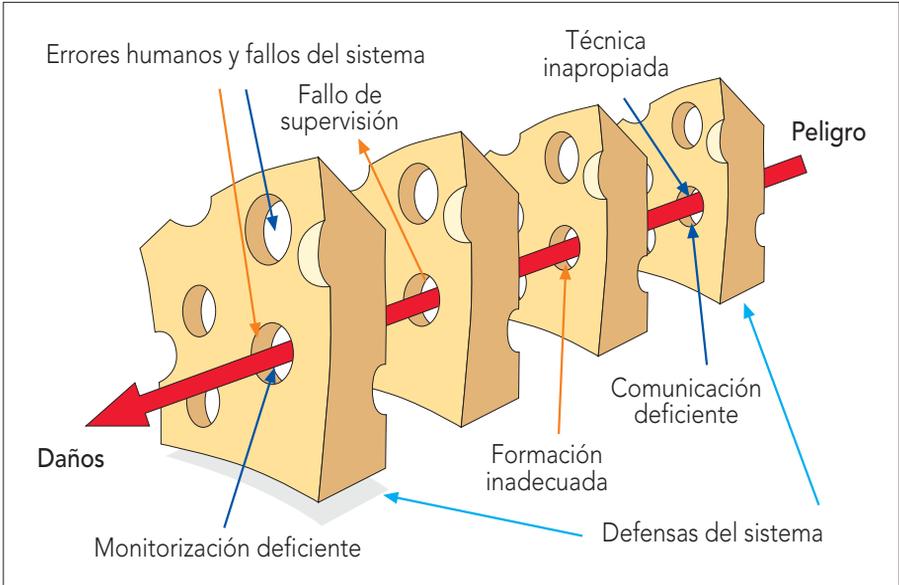


Figura 1. Modelo de error del queso suizo (extraída de Reason J et al, 1990). La fatalidad suele darse por un cúmulo de casualidades.

llegara el caso. Pero si la luz se va durante las vacaciones y los tejidos guardados en el ultracongelador se descongelan y vuelven a congelarse sin que nadie se percate, los experimentos se realizarán como si no hubiera pasado nada y los resultados pueden ser extraños o incongruentes sin saber exactamente la razón.

El modelo de error que se puede aplicar en cualquier estudio experimental es el modelo del queso suizo, o de efecto acumulativo, modelo utilizado también en el análisis y gestión de riesgos usados en la aviación, la ingeniería y la asistencia sanitaria. En este modelo, las defensas de una organización contra el fracaso se modelan como una serie de barreras, representadas como rebanadas de queso. Los agujeros en las rebanadas representan debilidades en partes individuales del sistema y están variando continuamente en tamaño y posición a través de las cortes. El sistema produce fallos cuando los agujeros en cada rebanada se alinean momentáneamente permitiendo que un peligro pase a través de los agujeros en todas las rebanadas conduciendo al fallo (Fig. 1).

Por ello, existen una serie de factores que si se tienen bajo control desde el inicio del estudio, se logrará minimizar el riesgo de accidentes y la probabilidad de errores.



Figura 2. Manipulación de las muestras. La flecha marca la típica caja que puede quedar fuera del ultracongelador por un descuido mientras se manipulan otras cajas de muestras.

RESERVA DEL ESPACIO DE ALMACENAMIENTO

Prever y tener reservado un espacio suficiente en el ultracongelador para guardar las muestras que se generaran durante el estudio y poder mantenerlas ordenadas dentro del mismo durante todo el estudio, puede ser un factor clave a la hora de evitar posibles ciclos de congelación/descongelación de las muestras y descuidos de cualquiera de los usuarios del ultracongelador. Tener las muestras perfectamente ordenadas y localizadas dentro del ultracongelador permite manipularlas de manera rápida y segura, de tal manera que ni las muestras van a estar fuera del congelador, ni el congelador abierto, más tiempo del necesario. Además, si existen dudas de donde están las muestras o si no están ordenadas adecuadamente, además de costar más su localización y extracción del congelador puede que sea necesario sacar unas muestras para acceder a otras, lo que puede favorecer el olvido de alguna muestra a la hora de volverlas a introducir en el ultracongelador (Fig. 2). En este sentido, hay que tener en cuenta que es relativamente fácil que le ocurra a una persona con sus propias muestras, si esa persona manipula las muestras de otra persona para acceder a las suyas, el riesgo de olvido o de falta de atención a la hora de la manipulación aumenta considerablemente. También es importante pensar que un congelador como cualquier "ecosistema" tiene tendencia al desorden y si los usuarios no son capaces de mantener el orden, el caos puede apoderarse del mismo. Este hecho, no es ninguna tontería porque el caos puede retrasar la realización de algún experimento simplemente por el miedo del investigador

a enfrentarse a dicho caos y ese miedo aumentará de manera proporcional al tiempo que haya transcurrido desde que las muestras están guardadas.

En definitiva, si el investigador es capaz de tener sus muestras ordenadas dentro del ultracongelador y fuera del alcance de otros investigadores, reducirá cualquier problema que pueda ocurrir con sus muestras.

ELECCIÓN DEL MATERIAL ADECUADO

En este apartado se analiza algo que parece bastante obvio pero a lo que a veces no se le presta especial atención y puede dar lugar a problemas o accidentes tontos que pueden retrasar o interrumpir el estudio. Al hilo de lo explicado en el apartado anterior, el orden en la identificación y localización de las muestras dentro del ultracongelador puede mantenerse más fácilmente mediante el uso de cajas y estantes específicos para el ultracongelador. Por el contrario, el caos se verá favorecido por el uso de bolsas de plástico, cajas de cartón u otros recipientes y contenedores de distinto tipo, composición y forma. Además, la utilización de material no adecuado y resistente a la ultracongelación puede provocar que algún recipiente se rompa y que las muestras se puedan estropear o perder dentro del mismo ultracongelador.

Por otro lado, también hay que tener claras las características del material utilizado y de los experimentos y procedimientos que se van a seguir con las muestras. Por ejemplo, el uso de tubos "ependorf" de mala calidad puede inducir roturas de los mismos durante la centrifugación o que los tubos, siendo de buena calidad, se rompan porque no soporten una ultracentrifugación (>100.000 rpm), pudiendo perder en ambos casos muestras valiosas. Otro caso en los que los materiales utilizados pueden ser críticos puede ser con el uso de nitrógeno líquido, o a la hora del etiquetado del material y si el material no es el óptimo puede ocurrir la pérdida de muestras o una mala identificación de las mismas. Por tanto, es muy importante que el investigador también sea cual es el mejor material fungible para su estudio y para las condiciones de recogida, procesamiento, manipulación y almacenamiento de sus muestras.

SISTEMA DE IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

Otro aspecto imprescindible es la identificación y etiquetado de las muestras de tal manera que éstas sean perfectamente reconocidas durante y después del estudio. Existen máquinas etiquetadoras que permiten crear numerosas etiquetas en un reducido periodo de tiempo, aunque también en muchos laboratorios

se sigue usando el sistema clásico manual mediante rotuladores permanentes. En el primer sistema es importante elegir bien las etiquetas y los cartuchos de tinta que se van a utilizar porque en algunos casos tienen que ser resistente al nitrógeno líquido o a la congelación. En el sistema manual es importante utilizar rotuladores de calidad y que la tinta sea indeleble y que no se borre fácilmente en condiciones de humedad de la muestra. Ambos sistemas también pueden reforzarse con cinta adhesiva cuando se considere necesario. En cualquier caso hay que tener en cuenta que la identificación de la muestra se debe realizar en más de una zona de la muestra (ej. lateral y tapa del tubo) para evitar posibles accidentes que puedan borrar o estropear alguna de las identificaciones.

Los dos sistemas pueden ser igualmente de eficaces aunque la ventaja del sistema de etiquetado automático es la estandarización de la identificación de las muestras del estudio independientemente del número de investigadores del estudio.

De todos modos por muy sofisticado que pueda ser el sistema de identificación lo más trascendente es la claridad de la escritura; se deben evitar tachones y/o sobrescritos encima de la identificación original siempre que sea posible (Fig. 3). Esto es importante para el propio investigador, pero también pensando en colaboradores o servicios de investigación a los que se les envíen muestras para realizar alguna determinación. Se puede correr el riesgo de que la otra persona no entienda o confunda lo que está escrito y que haya algún retraso o error en las determinaciones (Fig. 3).

DEFINIR LOS NIVELES DE ORGANIZACIÓN DE LAS MUESTRAS

Este aspecto puede ser interesante sobre todo para investigadores noveles que hayan empezado en la investigación recientemente porque puede darles alguna idea para facilitar su trabajo de experimentación. A pesar de tener los tubos de las muestras debidamente identificadas es conveniente usar algún otro sistema de ordenación de las mismas durante su manipulación y su almacenamiento. Existen tubos "ependorf", piezas para tapas de tubos criogénicos y pegatinas de todo tipo de colores, lo que permite la utilización de un código de color para cada tipo de muestra: rojo (sangre total), amarillo (orina), azul (saliva), transparente (líquido amniótico). Además, durante el experimento las muestras se pueden colocar en la gradilla siempre de la misma manera, ordenadas por orden alfabético y numérico (por ejemplo, Cáncer1, Cáncer2, Control1, Control2, Tratado1, Tratado2) o por clasificación de los grupos (Control, Cáncer, Tratado). Cada código será importante por sí mismo pero también en



Figura 3. Claridad en la identificación de las muestras. Se deben evitar los tachones y sobrescritos en la identificación de las muestras.

su conjunto, y el investigador tiene que tener claro cuál es su orden prioritario; es decir, a que código hará caso antes que a los otros, si al color, al orden de las muestras en la gradilla o a la identificación de la etiqueta del tubo (Fig. 4). Este protocolo de actuación puede ayudar al investigador a detectar posibles errores en la identificación de las muestras. Por ejemplo, es fácil que durante el procedimiento animal a pesar de los tubos estén perfectamente etiquetados, con el estrés del momento se confunda un tubo con otro y se cometa un error. Sin embargo es más difícil cometer un error con los colores asignados a cada tipo de muestra. Es decir que si se ve un tubo azul y en la etiqueta está escrito líquido amniótico, el investigador sabrá con certeza que es un error y que la muestra es saliva.

Por otro lado, es conveniente que el investigador mantenga la posición de las muestras en la gradilla incluso cuando éstas se ponen en hielo, cuando se introducen en la centrífuga y cuando se guardan en la caja para su almacenamiento. Si el investigador quiere aleatorizar su estudio o su experimento debe



Figura 4. Niveles de organización de las muestras. Mantener estos niveles durante todo el estudio puede ayudar a detectar posibles errores en el orden de almacenamiento de las muestras.

hacerlo desde el procedimiento animal o al añadir la muestra en la placa (ej. para un ELISA) respectivamente, pero siempre es recomendable volver a guardar manteniendo el mismo orden. Con ello el investigador puede tener la posibilidad de identificar posibles errores de identificación de las muestras (ej. pérdida de la etiqueta), no solo durante el experimento, sino también durante su almacenamiento en el ultracongelador. Además, si otro investigador necesita realizar un experimento con las muestras del primer investigador, entre ambos podrán solucionar cualquier error o malentendido con la clasificación de las muestras.

USO DE NITRÓGENO LÍQUIDO

El uso de elementos como el nitrógeno líquido o el hielo seco es habitual en cualquier estudio experimental, tanto para la congelación rápida de las muestras durante el procedimiento animal como después para manipulación de las mismas. Por ello el investigador deberá utilizar material de protección adecuado para la manipulación, guantes, gafas, pinzas, etc., y saber cómo proceder con ellos tanto para su seguridad y la de otros investigadores como para la de las propias muestras y del estudio. En ciertas ocasiones el investigador tendrá que sacar muestras del ultracongelador para realizar un experimento o para realizar un envío, y en todo momento las muestras deberán mantenerse congeladas para evitar posibles ciclos de congelación/descongelación. Por ejemplo, si se trabaja con tejidos muchas veces hay que cortar y pesar un trozo de los mismos

para realizar experimentos, y si son tejidos pequeños (por ejemplo muestras de roedores recién nacidos) hay que prestar atención porque pueden descongelarse rápidamente. En este sentido, si las muestras tienen que entrar en contacto con otros objetos, pinzas, cuchilla, las muestras tenderán a coger la temperatura de los mismos. Por ello es recomendable haber llevado dichos objetos a bajas temperaturas mediante su inmersión en nitrógeno líquido o hielo seco.

Cuando se tenga que realizar la búsqueda o la preparación de muestras para un experimento o un envío es también recomendable bañarlas total o parcialmente en nitrógeno líquido o depositarlas sobre abundante hielo seco. El investigador sabrá que lo está haciendo bien cuando tenga dificultades para manipular las muestras sin protección, es decir cuando las muestras quemen debido al frío. Por otro lado, cuando se realice un envío, las muestras deberán ir acompañadas de suficiente cantidad de hielo seco para que aguanten congeladas durante todo el viaje. Además, si las muestras tienen que pasar controles de aduana es aconsejable realizar los envíos en lunes para evitar posibles retenciones que lleven a la ruina las muestras y el estudio.

Evidentemente a pesar de todo lo comentado en este capítulo, el investigador tendrá que enfrentarse frecuentemente a situaciones, condiciones o resultados inesperados y tendrá que tener la capacidad de improvisar para reaccionar de la mejor manera posible, solventando posibles problemas y reconduciendo el estudio. Sin embargo, si el investigador es capaz de seguir algunas de las pautas citadas anteriormente seguramente la frecuencia de sobresaltos será menor y la probabilidad de éxito del estudio mayor.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pandol SJ, Saluja AK, Imrie CW, et al. Acute pancreatitis: bench to the bedside. *Gastroenterology*. 2007; 132: 1127-51.
2. Escobar J, Cubells E, Enomoto M, et al. Prolonging in utero-like oxygenation after birth diminishes oxidative stress in the lung and brain of mice pups. *Redox Biol*. 2013; 1: 297-303.
3. Reason J. The contribution of latent human failures to the breakdown of complex systems. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1990; 327: 475-84.

