

# **MODELOS EXPERIMENTALES PEDIÁTRICOS Y OBSTÉTRICOS**

**Comisión de Experimentación Animal**

**Red de Salud Maternoinfantil y del Desarrollo (RED SAMID)**



**Coordinador**

**Jesús López-Herce Cid**

**Abril 2015**

## **Autores**

### ***Coordinador***

Jesús López-Herce Cid

### ***Autores***

- Laura Almeida Toledano. Hospital San Juan de Dios de Barcelona.
- Ane Miren Andrés Moreno. Hospital Universitario La Paz de Madrid.
- Yolanda Ballesteró Díez. Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid
- Elena Cubells. Grupo de Investigación Perinatal. Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia.
- Jose Luis Encinas Hernández. Hospital Universitario La Paz de Madrid.
- Javier Justo Escobar Cubiella. Grupo de Investigación Perinatal. Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia.
- Sarah Nicole Fernández Lafever. Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid.
- Oscar García Algar. Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Médicas. Barcelona.
- Ángel Gil Hernández. Instituto de Nutrición y Tecnología De Alimentos “José Mataix” Universidad de Granada.
- María Dolores Gómez Roig. Hospital San Juan de Dios de Barcelona.
- Eduard Gratacos Solsona. Hospital San Juan de Dios de Barcelona.
- Rafael González Cortés. Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid.
- Miriam Illa Armengol. Hospital San Juan de Dios de Barcelona.

- Javier Joya Cecilia. Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Médicas. Barcelona.
- Jon Lopez de Heredia y Goya. Hospital Universitario Cruces/BioCruces. Baracaldo.
- Jorge López González. Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid
- Jesús López-Herce Cid. Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid
- Leopoldo Martínez Martínez. Hospital Universitario La Paz de Madrid.
- María Dolores Mesa García. Instituto de Nutrición y Tecnología De Alimentos “José Mataix” Universidad de Granada.
- Victoria Eugenia Mielgo Turuelo. Hospital Universitario Cruces/BioCruces. Baracaldo.
- Cristina Pujades Corbi. Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Médicas. Barcelona
- Maria del Carmen Rey Santano. Hospital Universitario Cruces/BioCruces. Baracaldo.
- Maria José Santiago Lozano. Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid.
- Maria José Solana García. Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid
- Blanca Toledo Del Castillo. Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid.
- Isabel Torres-Cuevas. Grupo de Investigación Perinatal. Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia.

- Javier Urbano Villaescusa. Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid.
- Oriol Vall Combelles. Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Médicas. Barcelona.
- Máximo Vento. Grupo de Investigación Perinatal. Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia.

## Indice

- 1. Modelo de encefalopatía hipóxico-isquémica en cerdo neonatal.** M<sup>a</sup> Carmen Rey Santano, Jon López de Heredia y Goya, Victoria Eugenia Mielgo Turuelo. Hospital Universitario Cruces/BioCruces. Baracaldo.
- 2. Modelo de síndrome de aspiración meconial en corderos neonatales.** M<sup>a</sup> Carmen Rey Santano, Jon Lopez de Heredia y Goya, Victoria Eugenia Mielgo Turuelo. Hospital Universitario Cruces/BioCruces. Baracaldo.
- 3. Modelo de síndrome de Dificultad Respiratoria Neonatal (SDR) en corderos prematuros.** M<sup>a</sup> Carmen Rey Santano, Jon Lopez de Heredia y Goya, Victoria Eugenia Mielgo Turuelo. Hospital Universitario Cruces/BioCruces. Baracaldo.
- 4. Modelo de Síndrome de Dificultad Respiratoria Aguda mediante lavado broncoalveolar en cerdo neonatal.** M<sup>a</sup> Carmen Rey Santano, Jon Lopez de Heredia y Goya, Victoria Eugenia Mielgo Turuelo. Hospital Universitario Cruces/BioCruces. Baracaldo.
- 5. Modelo de SDRA mediante lavado broncoalveolar en rata adulta.** M<sup>a</sup> Carmen Rey Santano, Jon Lopez de Heredia y Goya, Victoria Eugenia Mielgo Turuelo. Hospital Universitario Cruces/BioCruces. Baracaldo.
- 6. Modelo de shock cardiogénico en cerdo neonatal.** M<sup>a</sup> Carmen Rey Santano, Jon Lopez de Heredia y Goya, Victoria Eugenia Mielgo Turuelo. Hospital Universitario Cruces/BioCruces. Baracaldo.
- 7. Modelo neonatal de estudio farmacocinético y farmacodinámico en fármacos en cerdos (analgésicos).** M<sup>a</sup> Carmen Rey Santano, Jon Lopez de Heredia y Goya, Victoria Eugenia Mielgo Turuelo. Hospital Universitario Cruces/BioCruces. Baracaldo.

8. **Modelo experimental de atresia de esófago en roedores inducida con adriamicina.** Leopoldo Martínez Martínez. Hospital Universitario La Paz de Madrid.
9. **Modelo experimental de mielomeningocele en roedores inducido con ácido retinoico.** Jose Luis Encinas Hernández, Leopoldo Martínez Martínez. Hospital Universitario La Paz de Madrid.
10. **Modelo experimental de hernia diafragmática congénita en roedores inducida con nitrofen.** Leopoldo Martínez Martínez. Hospital Universitario La Paz de Madrid.
11. **Modelo experimental de trasplante intestinal en ratas.** Ane Miren Andrés Moreno, Leopoldo Martínez Martínez. Hospital Universitario La Paz de Madrid.
12. **Modelo experimental de parada cardiaca asfíctica en cerdos.** Jorge López González, Blanca Toledo Del Castillo, Javier Urbano Villaescusa, Jesús López-Herce Cid. Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid
13. **Modelo experimental de shock hipovolémico por hemorragia controlada en cerdos pediátricos.** Javier Urbano Villaescusa, Jesús López-Herce Cid. Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid
14. **Modelo experimental de shock hipovolémico por hemorragia no controlada en cerdos pediátricos.** Javier Urbano Villaescusa, Jesús López-Herce Cid, Rafael González Cortés. Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid

15. **Modelo experimental de shock hipovolémico en ratas.** Yolanda Ballesteró Díez, María José Solana García, Jesús López-Herce Cid. Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid
16. **Modelo experimental de insuficiencia renal aguda no oligúrica y técnica de depuración extrarrenal continua en cerdos pediátricos.** Sarah Nicole Fernández Lafever, María José Santiago Lozano, Jesús López-Herce Cid. Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid
17. **Modelo experimental de síndrome de alcohol fetal en ratonas gestantes.** Laura Almeida Toledano, Miriam Illa Armengol, María Dolores Gómez Roig, Eduard Gratacos Solsona. BCNAtal, Hospital Clínico y Hospital San Juan de Dios de Barcelona.
18. **Modelo de crecimiento intrauterino retardado por ligadura de vasos uteroplacentarios en coneja gestante.** Miriam Illa Armengol, María Dolores Gómez Roig, Eduard Gratacos Solsona. BCNAtal, Hospital Clínico y Hospital San Juan de Dios de Barcelona.
19. **Modelo de crecimiento intrauterino retardado por restricción de ingesta en coneja gestante.** Miriam Illa Armengol, María Dolores Gómez Roig, Eduard Gratacos Solsona. BCNAtal, Hospital Clínico y Hospital San Juan de Dios de Barcelona.
20. **Modelo de crecimiento intrauterino retardado restricción por reducción ingesta de proteínas en rata gestante.** Miriam Illa Armengol. BCNAtal, Hospital Clínico y Hospital San Juan de Dios de Barcelona.
21. **Modelo experimental de cámara cicladora de oxígeno para estudios de hipoxia-hiperoxia en roedores.** Isabel Torres-Cuevas, Elena Cubells,

Máximo Vento Javier Escobar Cubiella. Grupo de Investigación Perinatal.  
Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia.

**22. Modelo experimental de síndrome alcohólico fetal en pez cebra.**

Javier Joya Cecilia, Cristina Pujades Corbi, Oriol Vall Combelles, Oscar  
García Algar Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Médicas.  
Barcelona

**23. Modelo de obesidad y diabetes inducida con estreptozotocina y  
nicotinamida en ratas.** María Dolores Mesa García, Ángel Gil Hernández.

Instituto de Nutrición y Tecnología De Alimentos “José Mataix” Universidad  
de Granada.

**24. Modelo de alergenidad a proteínas alimentarias o sus hidrolizados  
en cobayas.** María Dolores Mesa García, Ángel Gil Hernández. Instituto de

Nutrición y Tecnología De Alimentos “José Mataix” Universidad de Granada.

## **INTRODUCCIÓN**

Un requisito previo fundamental para el desarrollo de proyectos de experimentación animal traslacional es la creación de modelos experimentales que, por una parte, simulen lo máximo posible la situación fisiopatológica a estudiar en el humano, y por otra, sean reproducibles, es decir que produzcan los mismos resultados de forma estable al repetirse en las mismas circunstancias.

Para el estudio de las enfermedades pediátricas y obstétricas, dada su gran variedad, es necesario el desarrollo de modelos muy diversos, que se adapten al tipo de paciente, de enfermedad, prueba diagnóstica o tratamiento a estudiar.

En Pediatría y Obstetricia pueden utilizarse muchos modelos animales. Los animales más utilizados son los roedores, cobayas, conejos, corderos, cerdos y pez cebra.

El objetivo de este documento es reunir y presentar una serie diversa de modelos animales pediátricos y obstétricos que han sido ya probados por grupos experimentales con experiencia y que pueden servir de base para el desarrollo de estudios experimentales.

# **1. MODELO DE ENCEFALOPATÍA HIPÓXICO-ISQUÉMICA EN CERDO NEONATAL**

M<sup>a</sup> Carmen Rey Santano

Jon López de Heredia y Goya

Victoria Eugenia Mielgo Turuelo

Plataforma Animalario y Experimentación Animal

Unidad Neonatal

Hospital Universitario Cruces/ Instituto BioCruces

Red de Salud Materno Infantil y del Desarrollo

### **Animales de experimentación**

Este modelo es llevado a cabo en cerdos de 1-3 días de vida, de la raza híbrida Dalling (peso medio: 1,5-2 kg). Los animales son obtenidos a través de una explotación agraria acreditada e inscrita por la autoridad competente, según normas y periodos establecidos en el Animalario del Hospital Universitario Cruces y alojados según la normativa vigente.

### **Procedimiento quirúrgico**

Los animales son sedados con ketamina, atropina y diazepam (15 mg/kg, 0,05 mg/kg y 2 mg/kg, respectivamente). Posteriormente se monitoria el electrocardiograma, la pulsioximetría, y la temperatura corporal y se introduce un catéter intravenoso de 24G en una vena periférica de la oreja para la inducción del plano anestésico con fentanilo y propofol (0,005 mg/kg y 1,2 mg/kg respectivamente). A continuación, los animales son traqueotomizados o intubados con un tubo endotraqueal 4 I.D. y mantenidos mediante ventilación mecánica con presión positiva manteniendo condiciones de normoxia y normocapnia. Los parámetros iniciales del respirador son: volumen corriente ( $V_T$ /kg) de entre 8-10 mL/kg; frecuencia respiratoria (fr) entre 20-30 rpm; presión positiva al final de la expiración (PEEP) de 3 cm H<sub>2</sub>O; presión inspiratoria pico (PIP) de 12 cm H<sub>2</sub>O; fracción inspiratoria de oxígeno ( $F_{iO_2}$ ) entre 25 - 30 %.

Una vez iniciada la ventilación mecánica y comprobada la ausencia de síntomas de dolor, se induce la parálisis muscular con bromuro de vecuronio (1,5 mg/kg). La anestesia, la analgesia y el paralizante muscular se mantienen con una infusión continua de propofol, midazolam, fentanilo y bromuro de

vecuronio (3 mg/kg/h, 0,5 mg/kg/h, 0,004 mg/kg/h y 3 mg/kg/h respectivamente). El volumen de fluidos de reposición fue de 10 mL/kg/h.

La arteria femoral se cánula con un catéter de termodilución arterial mediante una incisión abierta. Este catéter permite el cálculo del gasto cardiaco continuo, la medición de la presión arterial mediante la colocación de un transductor de presión y la extracción de muestras de sangre. Posteriormente se cateterizó la vena yugular externa con un catéter venoso central de 5 Fr y 2 luces, introduciéndolo hasta la entrada de la aurícula derecha. A este catéter se le acopló en la luz distal, un sensor de temperatura para el cálculo del gasto cardiaco por termodilución, mientras que la luz proximal se utilizó para el soporte de mantenimiento (fluidoterapia, soporte cardiogénico, etc.) y la medición de la presión venosa central (PVC).

Finalmente, se aíslan las dos arterias carótidas comunes con oclusores vasculares atraumáticos y en una de ellas se instaló una sonda Doppler no invasiva para medir el flujo carotideo continuo.

### **Daño hipóxico-isquémico**

La inducción del daño hipóxico-isquémico tiene lugar mediante la oclusión reversible de ambas carótidas y la reducción de la  $F_{iO_2}$  entre 8 – 10% durante 20 minutos. La oclusión de las carótidas se lleva a cabo mediante el uso de oclusores vasculares atraumáticos, comprobando la ausencia de flujo sanguíneo mediante una sonda doppler colocada en una de las carótidas.

### **Monitorización, determinación y cálculo de parámetros**

En cada uno de los animales de experimentación se monitorizan los siguientes parámetros que se describen a continuación:

- Parámetros de intercambio gaseoso: para la determinación de los parámetros de intercambio gaseoso se extraen muestras de sangre arterial y venosa y se determinaron parámetros  $P_{O_2}$ ,  $P_{CO_2}$ , pH arterial, el exceso de bases (EB) y los niveles del ion bicarbonato ( $HCO_3^-$ ).
- Parámetros hemodinámicos: se determinó el: electrocardiograma, TAM, PVC, flujo carotídeo, GC continuo, el volumen sistólico (VS), la frecuencia cardíaca (FC), la resistencia vascular sistémica (SVR), el volumen global al final de la diástole (GEDV), el volumen de sangre intratorácico (ITBV), la variación del volumen sistólico (SVV), la variación de la presión del pulso (PPV), el agua pulmonar extravascular (EVLW), el índice de permeabilidad pulmonar vascular (PVPI), la fracción de eyección global (GEF), el índice de función cardíaca (CFI) y la velocidad de aumento de la presión arterial (dP/mx),
- Mecánica pulmonar: se utiliza un módulo de espirometría adaptado al tubo endotraqueal para determinar el volumen corriente ( $V_T$ ), el volumen minuto ( $V_{min}$ ), la distensibilidad del sistema respiratorio ( $C_{dyn}$ ), la resistencia de la vía aérea ( $R_{aw}$ ).
- Oxigenación cerebral: La oxigenación cerebral se determina mediante espectroscopía cercana al infrarrojo (NIRS), de utilidad para medir el índice de oxigenación de los tejidos (TOI), el índice de hemoglobina tisular (nTHI), los cambios en la concentración de hemoglobina oxigenada ( $\Delta O_2Hb$ ), la hemoglobina desoxigenada ( $\Delta HHb$ ) y la hemoglobina total ( $\Delta cHb$ ) en tiempo real.

- Electroencefalografía amplificada: Se usa un electroencefalógrafo de dos canales, que permitió un seguimiento de la actividad cerebral en tiempo real de los dos hemisferios cerebrales

### **Grupos experimentales**

Los animales se distribuyen de forma aleatoria en grupos terapéuticos según los fármacos o técnicas a estudiar.

### **Registro de datos**

En todos los grupos controles y experimentales, se valora el efecto de las diferentes intervenciones experimentales en el intercambio gaseoso, parámetros hemodinámicos, mecánica pulmonar, oxigenación cerebral y electroencefalografía en los intervalos basal y post hipoxia-isquemia, y a los 5, 15, 30 y cada 30 minutos hasta el final del procedimiento experimental.

### **Finalización del procedimiento y eutanasia**

Una vez finalizado el procedimiento experimental, todos los animales son sacrificados mediante la administración de una dosis de anestésico (propofol; 20 mg/kg; 10 mg/mL), un paralizante muscular (besilato de atracurio; 1,2 mg/kg; 10 mg/mL) y en último lugar un despolarizante de la contracción cardiaca (cloruro potásico; 200 mg/kg; 50 mg/mL).

### **Bibliografía**

- Lafuente H, Alvarez Fj, Pazos Mr, Alvarez A, Rey-Santano Mc, Mielgo V, Murgia-Esteve X, Hilario E, Martinez-Orgado J. Cannabidiol reduces brain damage and improves functional recovery after acute hypoxia-ischemia in newborn pigs. *Pediatr Res.* 2011;70:272-7.
- Alvarez FJ, Lafuente H, Rey-Santano MC, Mielgo VE, Gastiasoro E, Rueda M, Pertwee RG, Castillo AI, Romero J, Martinez-Orgado J. Neuroprotective

Effects of the Nonpsychoactive Cannabinoid Cannabidiol in Hypoxic-Ischemic Newborn Piglets. *Pediatr Res* 2008;64:653-8

- Alonso-Alconada D, Broad KD, Bainbridge A, Chandrasekaran M, Faulkner SD, Kerenyi Á, Hassell J, Rocha-Ferreira E, Hristova M, Fleiss B, Bennett K, Kelen D, Cady E, Gressens P, Golay X, Robertson NJ. Brain cell death is reduced with cooling by 3.5°C to 5°C but increased with cooling by 8.5°C in a piglet asphyxia model. *Stroke*. 2015;46:275-8

## **2. MODELO DE SÍNDROME DE ASPIRACIÓN MECONIAL EN CORDEROS NEONATALES**

M<sup>a</sup> Carmen Rey Santano

Jon López de Heredia y Goya

Victoria Eugenia Mielgo Turuelo

Plataforma del Animalario y Experimentación Animal

Unidad Neonatal

Hospital Universitario Cruces/ Instituto BioCruces

Red de Salud Materno Infantil y del Desarrollo

### **Animales de experimentación**

El estudio se lleva a cabo en corderos recién nacidos sanos, de raza Latxa, con menos de 6 días de vida postnatal ( $5 \pm 1$  días) y con un peso de 4-6 kg.

El día anterior al experimento, los corderos se transportan desde la granja autorizada por el Órgano Competente de nuestra comunidad y mantenidos en cuarentena en el Animalario del Hospital Universitario Cruces. Los corderos son alojados en las instalaciones habilitadas para ello según la normativa vigente. El procedimiento experimental es diseñado por personal acreditado y supervisado por el responsable del Animalario.

### **Anestesia e intervención quirúrgica**

Todos los animales se sedan con una dosis intramuscular de ketamina hidroclorada (30 mg/kg; 50 mg/mL) y se anestesian con fentanilo intraperitoneal (5 ug/kg; 50 ug/mL). Esta anestesia permite la cateterización (20 GA,) de la vena radial de la pata derecha, para el mantenimiento del equilibrio hidroeléctrico mediante la infusión continua de solución glucosada al 5% (10 mg/kg/h) y para el mantenimiento del régimen de anestésicos constituido por ketamina hidroclorada (4 mg/kg/h) y fentanilo (0,05 ug/kg/h).

A continuación, se realiza una traqueotomía insertando un tubo endotraqueal de doble luz de 5.0 mm (Figura 1), que será conectado a un respirador neonatal convencional para neonatos iniciándose la ventilación mecánica.

Mediante disección se coloca un catéter umbilical (8 Fr) en la arteria femoral izquierda. A través de este catéter se extraen muestras sanguíneas para la determinación del intercambio gaseoso (pH,  $P_{aO_2}$ ,  $P_{aCO_2}$ , exceso de bases, bicarbonatos y  $S_{aO_2}$ ). También se conecta un transductor de presión para la

monitorización continua de la tensión arterial media (TAM) y de la frecuencia cardiaca (FC).

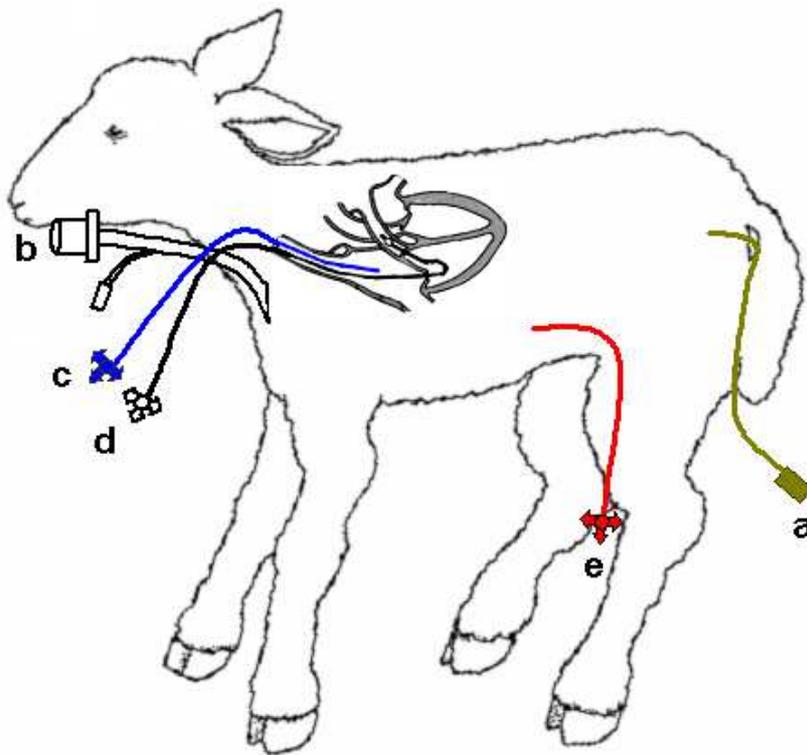


Figura 1. Esquema de los accesos quirúrgicos de los catéteres en el cordero. a. sonda de temperatura. b. tubo endotraqueal (ventilación mecánica controlada). c. catéter situado en aurícula derecha (fluidoterapia e inyección de suero salino frío para la determinación del gasto cardiaco). d. catéter Swan-Ganz situado en la arteria pulmonar (medición de la presión en la arteria pulmonar y del gasto cardiaco). e. catéter situado en la arteria femoral (gases en sangre, tensión arterial y frecuencia cardiaca).

Las presiones en el sistema pulmonar se miden mediante la colocación de un catéter en la parte derecha del corazón mediante la técnica de Swan-Ganz. Para ello, mediante disección, se aísla la vena yugular derecha y se introdujo un catéter de termodilución (5 Fr). Para guiar la colocación del catéter es necesario la conexión de este a un monitor de presión, de esta forma

observando la variación de las ondas de presión se puede saber en que punto del recorrido nos encontramos en cada momento. Una vez se introduce el catéter por la vena yugular, la primera curva de presión que se registra corresponde a la presión venosa central (PVC). En este momento se infla el balón, que el catéter presenta en el extremo, para que sea fácilmente arrastrado por la corriente sanguínea hasta la aurícula derecha, y de aquí atravesando la válvula tricúspide, al ventrículo derecho. Después de atravesar la válvula pulmonar el balón se deshincha y se obtiene la lectura de la presión de la arteria pulmonar (PAP).

Este catéter se conecta a un transductor de presión para la monitorización continua de la PAP. Otro catéter (8 Fr) se introduce por la vena yugular izquierda hasta la aurícula derecha utilizándose para la infusión de suero salino frío, para la determinación del GC.

Durante la introducción de ambos catéteres, la posición exacta en cada momento se verifica mediante el trazado de las curvas de presión registradas de forma continua. Al final del experimento, la posición de los catéteres se confirma en la necropsia.

En todos los animales se monitoriza la temperatura de forma continua mediante una sonda rectal y se mantiene entre 38-39°C mediante una cuna de calor radiante servocontrolada.

### **Manejo ventilatorio**

Los animales se conectan a través del tubo endotraqueal, a un ventilador neonatal de flujo continuo, ciclado por tiempo y limitado por presión, iniciándose la ventilación mecánica controlada con unos parámetros de respirador basales iguales en todos los animales (Tabla I).

### **Tabla I Parámetros ventilatorios**

<b><u>Parámetro</u></b>	<b><u>Valor Basal</u></b>
$f_R$ (ciclos·min <sup>-1</sup> )	30
PIP (cmH <sub>2</sub> O)	12
PEEP (cmH <sub>2</sub> O)	2
Relación I:E	1:2
$F_{IO_2}$	1.0
<u>Flujo (L·min<sup>-1</sup>)</u>	<u>10</u>

Tras la conexión al respirador, se administra besilato de atracurio (1,2 mg/kg; 10 mg/ml) como bloqueante neuromuscular para evitar la respiración espontánea. La parálisis respiratoria se mantiene mediante una perfusión continua de besilato de atracurio (1,2 mg/kg/h) con una bomba de perfusión durante los 180 minutos de periodo experimental.

#### **Aspiración meconial experimental**

En los grupos experimentales, el síndrome de aspiración meconial (SAM) se induce mediante la instilación traqueal de meconio. El meconio es recogido de recién nacidos a término sanos de ambos sexos, nacidos en el Hospital Universitario Cruces. El material obtenido se pesa y se resuspende en suero salino a una concentración del 20%. La disolución de meconio se almacena a -20°C en forma de alícuotas hasta su posterior utilización.

En cada animal se instilan 3-5 mL·kg<sup>-1</sup> de la solución de meconio al 20%, a través de un tubo lateral del tubo endotraqueal, durante 10 minutos sin interrupción de la ventilación. Durante la administración de meconio se modifican los parámetros ventilatorios, para permitir un adecuado movimiento

torácico, aumentando la PIP hasta 25-30 cmH<sub>2</sub>O, la PEEP hasta 5-7 cmH<sub>2</sub>O y la  $f_R$  hasta un máximo de 60 ciclos·min<sup>-1</sup>.

### **Determinación y cálculo de parámetros**

- La determinación del intercambio gaseoso se realiza en muestras de sangre obtenidas de la arteria femoral y se determinan los siguientes parámetros: pH,  $P_{aO_2}$ ,  $P_{aCO_2}$ , exceso de bases, bicarbonatos y  $S_{aO_2}$ .
- La monitorización de los parámetros cardiovasculares se obtiene mediante el uso de un transductor de presión para la determinación de la TAM, de la FC y de la PAP. La determinación del gasto cardiaco se basa en la técnica la termodilución. El valor del GC medido en cada punto de referencia se determina como el valor medio de tres determinaciones consecutivas.
- Para evaluar la efectividad de la ventilación mecánica en cada animal se determinan los índices ventilatorios: el índice de oxigenación (IO), el índice de eficacia ventilatoria (IEV), la diferencia alveolo-arterial de O<sub>2</sub> (A-aDO<sub>2</sub>) y la relación arterio-alveolar de O<sub>2</sub> (a/ADO<sub>2</sub>)
- Para la determinación y el cálculo de la función pulmonar se utiliza un sistema computerizado que recoge las señales de flujo y presión de la vía aérea de forma simultánea. Se determina el volumen corriente estandarizado ( $V_T$ ), la resistencia del sistema respiratorio ( $R$ ), la distensibilidad pulmonar dinámica estandarizada ( $C_{din}$ ) y la sobredistensión ( $C_{20}/C_{din}$ ).

### **Grupos experimentales**

Los animales se distribuyen de forma aleatoria en grupos terapéuticos según los fármacos o técnicas a estudiar.

### **Registro de datos**

En todos los grupos controles y experimentales, se valora el efecto de las diferentes intervenciones experimentales en el intercambio gaseoso, parámetros cardiovasculares, índices ventilatorio y mecánica pulmonar en los intervalos basal y post meconio, y a los 5, 15, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos *post hoc*.

### **Finalización del procedimiento y eutanasia**

Una vez finalizado el procedimiento experimental, todos los animales serán sacrificados mediante la administración de una dosis de anestésico (ketamina hidroclicorada; 4 mg/kg; 50 mg/mL), un paralizante muscular (besilato de atracurio; 1,2 mg/kg; 10 mg/mL) y en último lugar un despolarizante de la contracción cardíaca (cloruro potásico; 200 mg/kg; 50 mg/mL).

### **Bibliografía**

- Rey-Santano C, Mielgo VE, Gastiasoro E, Alvarez-Diaz FJ, Lafuente H, Valls-I-Soler A, Murgia X. Comparative effects of bronchoalveolar lavage with saline, surfactant or perfluorocarbon in experimental meconium aspiration syndrome. *Pediatr Crit Care Med*. 2012;13:e187-e194
- Rey-Santano C, Alvarez-Diaz FJ, Mielgo V, Murgia X, Lafuente H, Ruiz-Del-Yerro E, Valls-I-Soler A, Gastiasoro E. Bronchoalveolar lavage versus bolus administration of lucinactant, a synthetic surfactant in meconium aspiration in newborn lambs. *Pediatr Pulmonol*. 2011;46:991-9.
- Cochrane CG, Revak SD, Merritt TA, Schraufstatter IU, Hoch RC, Henderson C, Andersson S, Takamori H, Oades ZG. Bronchoalveolar lavage with KL4-Surfactant in models of meconium aspiration syndrome. *Pediatr Res* 1998; 44:705-15

### **3. MODELO DE SÍNDROME DE DISTRES RESPIRATORIO NEONATAL EN CORDEROS PREMATUROS**

M<sup>a</sup> Carmen Rey-Santano

Jon López de Heredia y Goya

Victoria Eugenia Mielgo Turuelo

Plataforma Animalario y Experimentación Animal

Unidad Neonatal

Hospital Universitario Cruces/ Instituto BioCruces

Red de Salud Materno Infantil y del Desarrollo

## **Animales de experimentación**

El estudio se lleva a cabo en corderos pretérmino de 133 días de edad gestacional (término:  $145 \pm 5$  días) obtenidos mediante cesárea, siguiendo todas las regulaciones para experimentación animal vigentes. A esta edad gestacional los corderos prematuros de la raza Latxa se ha descrito un distres respiratorio grave.

## **Protocolo quirúrgico**

La cesárea se lleva a cabo en ovejas preñadas en fecha conocida, a los 133 días de gestación. Las ovejas se sedan con xylazina (6-8 mg i.m.) y ketamina (5 mg/kg i.v.) y la anestesia se induce y mantiene con propofol (30-40 mg/kg/h). Mediante un laringoscopio adecuado se introduce un tubo endotraqueal nº8 y se conecta a un servoventilador con los siguientes parámetros: frecuencia (fr): 20 cpm;  $F_{IO_2}$ : 0.21-0.4; volumen corriente ( $V_T$ ): 500-600 mL; relación I:E 1:2; presiones inspiratoria/espíratória: 20/4 cmH<sub>2</sub>O. El mantenimiento de líquidos se realizará con una infusión continua de ringer lactato (10 mL/kg/h). En la arteria radial derecha se introducirá un catéter de 20G y se conectará un transductor de presión para la monitorización continua de la tensión arterial media (TAM) y de la frecuencia cardíaca (FC). Así mismo vigilan y controlan el pH,  $P_{aO_2}$ ,  $P_{aCO_2}$ , exceso de bases, bicarbonatos y  $S_{aO_2}$ .

Con la oveja recostada sobre su costado derecho se realizará una cesárea exponiendo el útero mediante una incisión subcostal y se exterioriza la cabeza del cordero. Se coloca un guante de goma sobre el hocico para prevenir respiraciones espontáneas. Mediante traqueotomía se inserta un tubo endotraqueal de 4 mm de diámetro hasta colocar la punta por encima de la carina, el tubo se ligará fuerte para prevenir fugas tanto de aire.

Mediante disección se insertan catéteres (8 Fr) en la vena yugular y en la arteria axilar. Se aísla la arteria carótida y se conecta una sonda doppler de flujo para la medición continua del flujo carotideo. Una vez finalizadas las canalizaciones se obtendrán muestras de sangre fetal para la determinación de gases en sangre y balance ácido-base y se administrará ketamina (8 mg) y bromuro de pancuronio (0.4 mg) al cordero, y se corta el cordón umbilical. Rápidamente, se pesa el cordero y se pone en una incubadora abierta conectando el tubo endotraqueal a un respirador de presión limitada con los siguientes parámetros iniciales: frecuencia 40 cpm; PIP/PEEP 25/5 cmH<sub>2</sub>O; relación I:E 1:2; FiO<sub>2</sub> 1.0 y flujo 10 lpm. Para el mantenimiento de la anestesia se infunde ketamina en glucosa al 5% (4 mg/kg/h).

Se monitorizará la temperatura rectal manteniéndola entre 38-39°C con una cuna de calor radiante servocontrolada (Becton-Dickinson Electrodine, MA, USA).

### **Determinación y cálculo de parámetros**

- La determinación del intercambio gaseoso se realiza en muestras de sangre obtenidas de la arteria axilar y vena yugular y se determinan los siguientes parámetros: pH,  $P_{aO_2}$ ,  $P_{aCO_2}$ , exceso de bases, bicarbonatos y  $S_{aO_2}$ .
- La monitorización de los parámetros cardiovasculares se obtiene mediante el uso de un transductor de presión para la determinación de la TAM, de la FC. Se realiza una monitorización de forma continua el flujo carotideo.
- Para evaluar la efectividad de la ventilación mecánica en cada animal se determinan los índices ventilatorios: el índice de oxigenación (IO), el índice de eficacia ventilatoria (IEV), la diferencia alveolo-arterial de O<sub>2</sub> (A-aDO<sub>2</sub>) y la relación arterio-alveolar de O<sub>2</sub> (a/ADO<sub>2</sub>)

- Para la determinación y el cálculo de la función pulmonar se utiliza un sistema computerizado que recoge las señales de flujo y presión de la vía aérea de forma simultánea. Se determina el volumen corriente estandarizado ( $V_T$ ), la resistencia del sistema respiratorio ( $R$ ), la distensibilidad pulmonar dinámica estandarizada ( $C_{din}$ ) y la sobredistensión ( $C_{20}/C_{din}$ ).

### **Grupos experimentales**

Los animales se distribuyen de forma aleatoria en grupos terapéuticos según los fármacos o técnicas a estudiar.

### **Registro de datos**

En todos los grupos controles y experimentales, se valora el efecto de las diferentes intervenciones experimentales en el intercambio gaseoso, parámetros cardiovasculares, índices ventilatorio y mecánica pulmonar en los intervalos fetal, basal (5 min. tras VMC), y a los 5, 15, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos *post hoc*.

### **Finalización del procedimiento y eutanasia**

Una vez finalizado el procedimiento experimental, todos los animales son sacrificados mediante la administración de una dosis de anestésico (ketamina hidroclicada; 4 mg/kg; 50 mg/mL), un paralizante muscular (besilato de atracurio; 1,2 mg/kg; 10 mg/mL) y en último lugar un despolarizante de la contracción cardíaca (cloruro potásico; 200 mg/kg; 50 mg/mL).

### **Bibliografía**

- Sato A, Ikegami M. SP-B and SP-C containing new synthetic surfactant for treatment of extremely immature lamb lung. PLoS One. 2012;7:e39392
- Murgia X, Mielgo V, Valls-I-Soler A, Ruiz-Del-Yerro E, Rey-Santano C. Aerosolized perfluorocarbon improves gas exchange and pulmonary

mechanics in preterm lambs with severe respiratory distress syndrome.

*Pediatr Res.* 2012;72:393-9

- Rey-Santano C, Mielgo VE, Andres L, Ruiz-Del-Yerro E, Valls-I-Soler A, Murgia X. Acute and sustained effects of aerosolized vs. bolus surfactant therapy in premature lambs with respiratory distress syndrome. *Pediatr Res.* 2013;73 :639-46
- Hillman NH, Nitsos I, Berry C, Pillow JJ, Kallapur SG, Jobe AH. Positive end-expiratory pressure and surfactant decrease lung injury during initiation of ventilation in fetal sheep. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2011 ;301(5):L712-20

#### **4. MODELO DE SINDROME DE SINDROME DE DIFICULTAD RESPIRATORIA AGUDA MEDIANTE LAVADO BROCOALVEOLAR EN CERDO**

M<sup>a</sup> Carmen Rey Santano

Jon Lopez de Heredia y Goya

Victoria Eugenia Mielgo Turuelo

Plataforma Animalario y Experimentación Animal

Unidad Neonatal

Hospital Universitario Cruces/ Instituto BioCruces

Red de Salud Materno Infantil y del Desarrollo

## **Animales de experimentación**

El estudio se lleva a cabo en cerdos neonatales de ambos sexos (2 a 4 días) con un peso medio de 1,5-2 kg.

Los animales son obtenidos a través de una explotación agraria acreditada e inscrita por la autoridad competente, según normas y periodos establecidos en el Animalario del Hospital Universitario Cruces y alojados según la normativa vigente.

## **Procedimiento quirúrgico**

Antes de la cirugía, los animales son pesados y sedados con una inyección intramuscular de ketamina (15 mg/kg), atropina (0,05 mg/kg) y diazepam (2 mg/kg). La analgesia y anestesia se mantiene con anestesia inhalada (servofluorano) mediante mascarilla. Cuando el animal esta relajado se procede a la entubación colocando un tubo endotraqueal (ID 3 mm) al que se le hincha el balón. El tubo se conecta a respirador convencional para neonatos con unos parámetros ventilatorios iniciales de: Presión inspiratoria pico - PIP 11 cmH<sub>2</sub>O; presión expiratoria positiva final - PEEP 3 cmH<sub>2</sub>O; frecuencia respiratoria - Fr 30 ciclos/min; ratio I:E 1:2; fracción inspiratoria de oxígeno - F<sub>iO<sub>2</sub></sub> 0,28. Además se conecta un espirómetro adaptado a un modulo de espirometria entre el tubo endotraqueal y el ventilador para las mediciones de los parámetros ventilatorios y de mecánica pulmonar (distensibilidad pulmonar - C<sub>dyn</sub>; Volumen corriente estandarizado - V<sub>T</sub>). Tras lo cual, y después de asegurar un buen grado de analgesia y anestesia mediante una administración continua de servofluorano en el animal, se paraliza a los animales mediante un bolus de besilato de atracurio (1,5 mg/kg).

Se procede a aislar la arteria femoral y se introdujo un catéter arterial de termodilución que se conectó a un transductor de presión para la medición de la tensión arterial media (TAM), el pulso cardiaco (PC), el gasto cardiaco (GC) y el volumen sistólico (VS). Además se obtuvieron muestras de sangre arteriales para la determinación del intercambio gaseoso ( $P_{aO_2}$ ;  $P_{aCO_2}$ ; pH; EB,  $S_{aO_2}$ ), el contenido arterial de oxígeno ( $C_{aO_2}$ ) y los niveles de lactato (mmol/l). Posteriormente, se aísla una de las venas yugulares y se introducen dos catéteres (5 Fr). Uno de ellos hacia el corazón, para la obtención de sangre venosa para el cálculo del contenido venoso de oxígeno a nivel sistémico ( $C_{vO_2}$ ) y la infusión de suero salino fisiológico frío para la calibración del gasto cardiaco por termodilución. Además se conecta un transductor de presión para la medición continua de la presión venosa central (PVC). El otro catéter se coloca en dirección al cerebro, para obtener muestras de sangre venosa, lo que nos permite el cálculo del contenido venoso de oxígeno ( $C_{vO_2}$ ) cerebral.

Se aísla una de las arterias carótidas y se sitúa una sonda ultrasónica de flujo para la determinación continua del flujo carotideo mediante la técnica “tiempo de tránsito”.

Finalmente para la medición de la oxigenación tisular se utiliza un monitor de NIRS para la medición continua del índice total de oxigenación (TOI) cerebral.

En todos los animales se monitoriza la temperatura de forma continua durante todo el experimento mediante una sonda rectal y se mantiene entre 38-39°C mediante una cuna de calor radiante servocontrolada

### **Lavados broncoalveolares para la inducción del daño pulmonar**

Tras el procedimiento quirúrgico se llevarán a cabo mediante lavados broncoalveolares (LBA) para producir la depleción del surfactante, mediante la

instilación de 30 ml/kg de suero salino fisiológico a 37°C. Estos lavados se repetirán tantas veces como sea necesario hasta obtener una  $P_{aO_2} < 100$  mmHg a una  $F_{iO_2}$  del 100%. Estos valores tienen que mantenerse constantes durante 45 minutos como parámetro indicativo de un daño pulmonar estable.

### **Monitorización, determinación y cálculo de parámetros**

En cada uno de los animales de experimentación se monitorizaron los siguientes parámetros que se describen a continuación:

- Parámetros de intercambio gaseoso: para la determinación de los parámetros de intercambio gaseoso se obtienen muestras de sangre arterial y venosa para la determinación de los parámetros  $P_{O_2}$ ,  $P_{CO_2}$ , pH, el exceso de bases (EB) y los niveles del ion bicarbonato ( $HCO_3$ ) y lactato.
- Parámetros hemodinámicos: se monitoriza el electrocardiograma, TAM, PVC, flujo carotideo, GC continuo, el volumen sistólico (VS), la frecuencia cardíaca (FC), la resistencia vascular sistémica (SVR), el volumen global al final de la diástole (GEDV), el volumen de sangre intratorácico (ITBV), la variación del volumen sistólico (SVV), la variación de la presión del pulso (PPV), el agua pulmonar extravascular (EVLW), el índice de permeabilidad pulmonar vascular (PVPI), la fracción de eyección global (GEF), el índice de función cardíaca (CFI) y la velocidad de aumento de la presión arterial (dP/mx).
- Determinación del metabolismo del oxígeno: cálculo del contenido arterial y venoso de oxígeno; consumo de oxígeno cerebral; y el aporte y extracción de oxígeno cerebral.
- La efectividad de la ventilación mecánica en cada animal se determina calculando los índices ventilatorios: el índice de oxigenación (IO), el índice

de eficacia ventilatoria (IEV), la diferencia alveolo-arterial de  $O_2$  (A-aDO<sub>2</sub>) y la relación arterio-alveolar de  $O_2$  (a/ADO<sub>2</sub>).

- Para la determinación de la función pulmonar se utiliza un módulo de espirometría adaptado al tubo endotraqueal que permite determinar el volumen corriente estandarizado ( $V_T$ ), la resistencia del sistema respiratorio ( $R$ ), la distensibilidad pulmonar dinámica estandarizada ( $C_{din}$ ).
- Oxigenación cerebral: La oxigenación cerebral se determina mediante espectroscopía cercana al infrarrojo (NIRS), de utilidad para medir el índice de oxigenación de los tejidos (TOI), el índice de hemoglobina tisular (nTHI), los cambios en la concentración de hemoglobina oxigenada ( $\Delta O_2Hb$ ), la hemoglobina desoxigenada ( $\Delta HHb$ ) y la hemoglobina total ( $\Delta cHb$ ) en tiempo real.

### **Grupos experimentales**

Los animales se distribuyen de forma aleatoria en grupos terapéuticos según los fármacos o técnicas a estudiar.

### **Registro de datos**

En todos los grupos controles y experimentales, se valora el efecto de las diferentes intervenciones experimentales en el intercambio gaseoso, parámetros hemodinámicos, metabolismo del oxígeno, índices ventilatorios, mecánica pulmonar y oxigenación cerebral en los intervalos basal y post lavados, y a los 5, 15, 30 y cada 30 minutos hasta el final del procedimiento experimental.

### **Finalización del procedimiento y eutanasia**

Una vez finalizado el procedimiento experimental, todos los animales son sacrificados mediante la administración de una dosis de anestésico (propofol);

20 mg/kg; 10 mg/ml), un paralizante muscular (besilato de atracurio; 1,2 mg/kg; 10 mg/ml) y en último lugar un despolarizante de la contracción cardiaca (cloruro potásico; 200 mg/kg; 50 mg/ml).

### **Bibliografía**

- Nold JL, Meyers PA, Worwa CT, Goertz RH, Huseby K, Schauer G, Mammel MC. Decreased lung injury after surfactant in piglets treated with continuous positive airway pressure or synchronized intermittent mandatory ventilation. *Neonatology*. 2007;92:19-25
- Lampland AL, Meyers PA, Worwa CT, Swanson EC, Mammel MC. Gas exchange and lung inflammation using nasal intermittent positive-pressure ventilation versus synchronized intermittent mandatory ventilation in piglets with saline lavage-induced lung injury: an observational study. *Crit Care Med*. 2008 ;36:183-7.

## **5. MODELO DE SDRA MEDIANTE LAVADO BROCOALVEOLAR EN RATA ADULTA**

M<sup>a</sup> Carmen Rey Santano

Jon López de Heredia y Goya

Victoria Eugenia Mielgo Turuelo

Plataforma Animalario y Experimentación Animal

Unidad Neonatal

Hospital Universitario Cruces/ Instituto BioCruces

Red de Salud Materno Infantil y del Desarrollo

### **Animales de experimentación**

El estudio se lleva a cabo en ratas adultas de ambos sexos con un peso medio de  $250 \pm 50$  kg.

Los animales son obtenidos a través de un suministrador acreditado, según normas y periodos establecidos en el Animalario del Hospital Universitario Cruces y alojados según la normativa vigente.

### **Procedimiento quirúrgico y parámetros ventilatorios.**

Los animales son anestesiados con ketamina por vía intramuscular (60 mg/kg; 50 mg/ml) y cinco minutos después con pentobarbital sódico intraperitoneal (21 mg/kg. 50 mg/ml). Con ayuda de un microscopio quirúrgico se cánula la tráquea con una sonda de 14G.

Después de iniciar la ventilación mecánica se cánula la arteria femoral izquierda con una sonda de 24G colocando un transductor de presión. Se utiliza un ventilador volumétrico con los siguientes parámetros iniciales:  $F_{iO_2} = 1.0$ ; I:E= 1: 1; Volumen corriente ( $V_T$ ): 8 ml/kg;  $f_r = 85$  cpm y una presión positiva espiratoria final (PEEP)=2 cmH<sub>2</sub>O, anotando la presión inspiratoria pico (PIP) alcanzada. A continuación, se administró una dosis de bromuro de pancuronio por vía intravascular (0.1 mg/kg; 2 mg/ml) repitiéndose esta dosis cada vez que fue necesario. Los animales se mantuvieron con una infusión continua de NaCl al 0.9% (3 ml/kg/h) con heparina sódica (1.5 mg/kg; 10 mg/ml). Bajo estas condiciones los animales fueron ventilados por un período de diez minutos.

### **Depleción de SF pulmonar.**

A continuación, todos los animales se someten a lavados broncoalveolares (LBA) repetidos por vía traqueal con 30 ml/kg de NaCl al 0,9% a 37°C, que es luego aspirado; repitiendo el ciclo otras dos veces. Se realizaron un total de

seis ciclos de LBA a intervalos de cinco minutos, recuperándose por lo menos el 95% del volumen instilado. Después del primer lavado se aumenta la PEEP a 5 cm H<sub>2</sub>O, manteniendo constantes los demás parámetros durante el resto del ensayo.

### **Monitorización, determinación y cálculo de parámetros**

En cada uno de los animales de experimentación se monitoriza los siguientes parámetros que se describen a continuación:

- Parámetros de intercambio gaseoso: para la determinación de los parámetros de intercambio gaseoso se extraen muestras sangre arterial para determinar el P<sub>O<sub>2</sub></sub>, P<sub>CO<sub>2</sub></sub>, pH, el exceso de bases (EB) y los niveles del ion bicarbonato (HCO<sub>3</sub>) y lactato.
- Parámetros hemodinámicos: se determina el electrocardiograma, TAM y la frecuencia cardiaca (FC).
- La efectividad de la ventilación mecánica en cada animal se determina calculando los índices ventilatorios: el índice de oxigenación (IO), el índice de eficacia ventilatoria (IEV), la diferencia alveolo-arterial de O<sub>2</sub> (A-aDO<sub>2</sub>) y la relación arterio-alveolar de O<sub>2</sub> (a/ADO<sub>2</sub>).
- Para la valoración de la función pulmonar se utiliza un módulo de espirometría adaptado al tubo endotraqueal que permite determinar el volumen corriente estandarizado (V<sub>T</sub>), la resistencia del sistema respiratorio (R), la distensibilidad pulmonar dinámica estandarizada (C<sub>din</sub>).

### **Grupos experimentales**

Los animales se distribuyen de forma aleatoria en grupos terapéuticos según los fármacos o técnicas a estudiar.

### **Registro de datos**

En todos los grupos controles y experimentales, se valora el efecto de las diferentes intervenciones experimentales en el intercambio gaseoso, parámetros hemodinámicos, metabolismo del oxígeno, índices ventilatorios, mecánica pulmonar y oxigenación cerebral en los intervalos basal y 5, 15, 30 y cada 30 minutos hasta el final del procedimiento experimental.

### **Finalización del procedimiento y eutanasia**

Una vez finalizado el procedimiento experimental, todos los animales son sacrificados mediante la administración de una dosis de anestésico (propofol; 20 mg/kg; 10 mg/mL), un paralizante muscular (besilato de atracurio; 1,2 mg/kg; 10 mg/mL) y en último lugar un despolarizante de la contracción cardíaca (cloruro potásico; 200 mg/kg; 50 mg/mL).

### **Bibliografía**

- Fernández-Ruanova MB, Alvarez FJ, Gastiasoro E, Arnaiz A, Robertson B, Curstedt T, Valls-i-Soler A. Comparison of rapid bolus instillation with simplified slow administration of surfactant in lung lavaged rats. *Pediatr Pulmonol.* 1998;26:129-34.
- Alvarez FJ, Alfonso LF, Gastiasoro E, Lopez-Heredia J, Arnaiz A, Valls-i-Soler A. The effects of multiple small doses of exogenous surfactant on experimental respiratory failure induced by lung lavage in rats. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1995;39:970-4.
- Lachmann B, Robertson B, Vogel J. In vivo lung lavage as an experimental model of the respiratory distress syndrome. *Acta Anaesthesiol Scand* 1980; 24:231-236.

## **6. MODELO DE SHOCK CARDIOGÉNICO EN CERDO NEONATAL**

M<sup>a</sup> Carmen Rey Santano

Jon López de Heredia y Goya

Victoria Eugenia Mielgo Turuelo

Plataforma Animalario y Experimentación Animal

Unidad Neonatal

Hospital Universitario Cruces/Instituto BioCruces

Red de Salud Materno Infantil y del Desarrollo

## **Animales de experimentación**

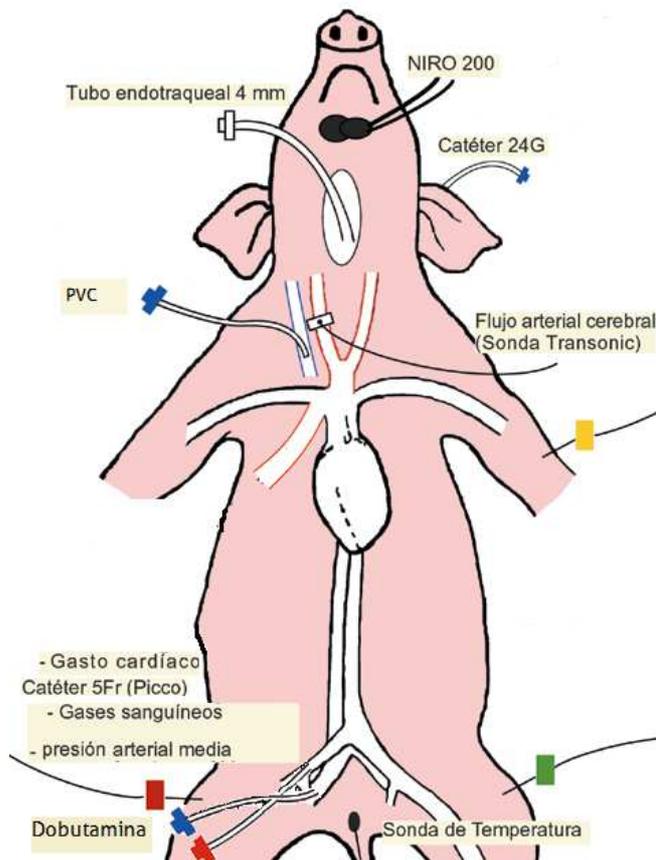
El estudio se lleva a cabo en cerdos neonatales de ambos sexos (2 a 4 días) con un peso medio de 1,5-2 kg. Los animales son obtenidos a través de una explotación agraria acreditada e inscrita por la autoridad competente, según normas y periodos establecidos en el Animalario del Hospital Universitario Cruces y alojados según la normativa vigente.

## **Procedimiento quirúrgico**

Antes de la cirugía, los animales son pesados y sedados con una inyección intramuscular de ketamina (15 mg/kg), atropina (0,05 mg/kg) y diazepam (2 mg/kg). Esta sedación permite la cateterización (24 GA) de la vena de la oreja para la inducción de la analgesia y la anestesia con un bolus de fentanilo (0,005 mg/kg) y propofol (1,2 mg/kg) respectivamente. La analgesia y anestesia son mantenidos con una bomba de infusión a lo largo de todo el procedimiento experimental mediante una infusión continua de fentanilo (0,004 mg/kg/h), midazolam (0,5 mg/kg/h) y propofol (3 mg/kg/h).

Posteriormente, se realiza una traqueotomía y se introduce un tubo endotraqueal (ID 4 mm), que fue conectado a un respirador convencional para neonatos con unos parámetros ventilatorios iniciales de: Presión inspiratoria pico - PIP 11 cmH<sub>2</sub>O; presión expiratoria positiva final - PEEP 3 cmH<sub>2</sub>O; frecuencia respiratoria - fr 30 ciclos/min; ratio I:E 1:2; fracción inspiratoria de oxígeno - F<sub>iO<sub>2</sub></sub> 0,28. Además se conecta un espirómetro adaptado a un modulo de espirometria entre el tubo endotraqueal y el ventilador para las mediciones de los parámetros ventilatorios y de mecánica pulmonar (distensibilidad pulmonar - C<sub>dyn</sub>; Volumen corriente estandarizado - V<sub>T</sub>). Tras lo cual, y después de asegurar un buen grado de analgesia y anestesia en el animal, se

paraliza a los animales mediante un bolus de besilato de atracurio (1,5 mg/kg) que se mantiene mediante infusión continua (3 mg/kg/h).



**Figura 1.** Esquema de los accesos quirúrgicos en el cerdo.

Se procede a aislar la arteria femoral y se introduce un catéter arterial de termodilución que se conecta a un transductor de presión para la medición de la tensión arterial media (TAM), el pulso cardíaco (PC), el gasto cardíaco (GC) y el volumen sistólico (VS). Además se obtuvieron muestras de sangre arteriales para la determinación del intercambio gaseoso ( $P_{aO_2}$ ;  $P_{aCO_2}$ ; pH; EB,  $S_{aO_2}$ ), el contenido arterial de oxígeno ( $C_{aO_2}$ ) y los niveles de lactato (mmol/l).

Posteriormente, se aísla una de las venas yugulares y se introducen dos catéteres (5 Fr). Uno de ellos hacia el corazón, para la obtención de sangre venosa para el cálculo del contenido venoso de oxígeno a nivel sistémico ( $C_{vO_2}$ )

y la infusión de suero salino fisiológico frío para la calibración del gasto cardíaco por termodilución. Además se conecta un transductor de presión para la medición continua de la presión venosa central (PVC). El otro catéter se coloca en dirección al cerebro, para obtener muestras de sangre venosa, lo que nos permite el cálculo del contenido venoso de oxígeno ( $C_{vO_2}$ ) cerebral.

Se aísla una de las arterias carótidas y se sitúa una sonda ultrasónica de flujo para la determinación continua del flujo carotideo mediante la técnica “tiempo de tránsito”.

Finalmente para la medición de la oxigenación tisular se utiliza un monitor de NIRS para la medición continua del índice total de oxigenación (TOI) cerebral y renal.

En todos los animales se monitoriza la temperatura de forma continua durante todo el experimento mediante una sonda rectal y se mantiene entre 38-39°C mediante una cuna de calor radiante servocontrolada

### **Producción del shock**

El shock se produce mediante la inducción de un daño hipóxico reduciendo la  $F_{iO_2}$  entre un 12-14% durante 2 horas.

### **Monitorización, determinación y cálculo de parámetros**

En cada uno de los animales de experimentación se monitorizaron los siguientes parámetros que se describen a continuación:

- Parámetros de intercambio gaseoso: para la determinación de los parámetros de intercambio gaseoso se obtienen muestras de sangre arterial y venosa para la determinación de  $P_{O_2}$ ,  $P_{CO_2}$ , pH arterial, el exceso de bases (EB) y los niveles del ion bicarbonato ( $HCO_3^-$ ) y lactato.

- Parámetros hemodinámicos: se monitoriza el electrocardiograma, TAM, PVC, flujo carotídeo, GC continuo, el volumen sistólico (VS), la frecuencia cardiaca (FC), la resistencia vascular sistémica (SVR), el volumen global al final de la diástole (GEDV), el volumen de sangre intratorácico (ITBV), la variación del volumen sistólico (SVV), la variación de la presión del pulso (PPV), el agua pulmonar extravascular (EVLW), el índice de permeabilidad pulmonar vascular (PVPI), la fracción de eyección global (GEF), el índice de función cardiaca (CFI) y la velocidad de aumento de la presión arterial (dP/mx).
- Determinación del metabolismo del oxígeno: calculo del contenido arterial y venoso de oxígeno; consumo de oxígeno cerebral y sistémico, y el aporte y extracción de oxígeno cerebral y sistémico.
- La efectividad de la ventilación mecánica en cada animal se determina calculando los índices ventilatorios: el índice de oxigenación (IO), el índice de eficacia ventilatoria (IEV), la diferencia alveolo-arterial de O<sub>2</sub> (A-aDO<sub>2</sub>) y la relación arterio-alveolar de O<sub>2</sub> (a/ADO<sub>2</sub>)
- Para la determinación de la función pulmonar se utiliza un módulo de espirometría adaptado al tubo endotraqueal que permite determinar la el volumen corriente estandarizado (V<sub>T</sub>), la resistencia del sistema respiratorio (R), la distensibilidad pulmonar dinámica estandarizada (C<sub>dyn</sub>).
- Oxigenación cerebral: La oxigenación cerebral se determina mediante espectroscopía cercana al infrarrojo (NIRS), de utilidad para medir el índice de oxigenación de los tejidos (TOI), el índice de hemoglobina tisular (nTHI), los cambios en la concentración de hemoglobina oxigenada ( $\Delta$ O<sub>2</sub>Hb), la hemoglobina desoxigenada ( $\Delta$ Hb) y la hemoglobina total ( $\Delta$ CHb) en tiempo real.

## **Grupos experimentales**

Los animales se distribuyen de forma aleatoria en grupos terapéuticos según los fármacos o técnicas a estudiar.

## **Registro de datos**

En todos los grupos controles y experimentales, se valora el efecto de las diferentes intervenciones experimentales en el intercambio gaseoso, parámetros hemodinámicos, metabolismo del oxígeno, índices ventilatorios, mecánica pulmonar y oxigenación cerebral en los intervalos basal y post hipoxia, y a los 5, 15, 30 y cada 30 minutos hasta el final del procedimiento experimental.

## **Finalización del procedimiento y eutanasia**

Una vez finalizado el procedimiento experimental, todos los animales son sacrificados mediante la administración de una dosis de anestésico (propofol; 20 mg/kg; 10 mg/mL), un paralizante muscular (besilato de atracurio; 1,2 mg/kg; 10 mg/mL) y en último lugar un despolarizante de la contracción cardiaca (cloruro potásico; 200 mg/kg; 50 mg/mL).

## **Bibliografía**

- Cheung PY, Barrington KJ, Bigam D. The hemodynamic effects of dobutamine infusion in the chronically instrumented newborn piglet. Crit Care Med. 1999;27:558-64
- Pearson RJ, Barrington KJ, Jirsch DW, Cheung PY. Dopaminergic receptor-mediated effects in the mesenteric vasculature and renal vasculature of the chronically instrumented newborn piglet. Crit Care Med. 1996;24(10):1706-12.

- Mielgo V, Valls I Soler A, Rey-Santano C. Dobutamine in paediatric population: a systematic review in juvenile animal models. PLoS One. 2014;9(4):e95644

## **7. MODELO NEONATAL DE ESTUDIO FARMACOCINÉTICO Y FARMACODINÁMICO EN FÁRMACOS EN CERDOS (Analgésicos)**

M<sup>a</sup> Carmen Rey Santano

Jon Lopez de Heredia y Goya

Victoria Eugenia Mielgo Turuelo

Plataforma Animalario y Experimentación Animal

Unidad Neonatal

Hospital Universitario Cruces/BioCruces

Red de Salud Materno Infantil y del Desarrollo

## **Animales de experimentación**

El estudio se lleva a cabo en cerdos neonatales de ambos sexos (2 a 4 días) con un peso medio de 1,5-2 kg.

Los animales son obtenidos a través de una explotación agraria acreditada e inscrita por la autoridad competente, según normas y periodos establecidos en el Animalario del Hospital Universitario Cruces y alojados según la normativa vigente.

## **Procedimiento quirúrgico**

Antes de la cirugía, los animales son pesados y sedados con una inyección intramuscular de ketamina (15 mg/kg), atropina (0,05 mg/kg) y diazepam (2 mg/kg). La analgesia y anestesia se mantiene con anestesia inhalada anestesia inhalatoria con sevoflurano al 6% mediante una mascarilla hasta obtener una relajación muscular adecuada para la intubación. Una vez intubado se conecta al respirador y se mantiene en ventilación mecánica convencional conectando el espirómetro y manteniendo la PIP: 10-12 cm H<sub>2</sub>O: PEEP: 4; I:E: 1:2; Fr:40 con la anestesia inhalatoria el tiempo que dure la cirugía.

Se conectan los electrodos de ECG para la medición de la frecuencia cardiaca y el sensor de pulsioximetría para la medición de saturación. Tras asegurar que el animal esta suficientemente anestesiado, se paraliza con vecuronio. Luego se procede a la cateterización de una arteria femoral para la medición de la tensión arterial, el pulso cardiaco y el gasto cardiaco, y se cánula la vena yugular para la infusión de los fármacos necesarios y para la calibración del gasto cardiaco por termodilución, además se aísla una arteria carótida para la medición continua del flujo carotideo

Finalmente se colocarán los electrodos de aEEG para la medición de actividad

cerebral y del NIRO para la medición continua de la oxigenación cerebral.

En todos los animales se monitoriza la temperatura de forma continua durante todo el experimento mediante una sonda rectal y se mantiene entre 38-39°C mediante una cuna de calor radiante servocontrolada.

### **Evaluación de analgésicos**

Se desconecta la anestesia inhalatoria y se procede a la infusión continua del analgésico a evaluar por vía i.v. a través de la vena yugular en la pauta indicada. Se extraerán muestras sanguíneas a diferentes tiempos en tubos de plasma o suero, que serán mantenidas en frío, y se conservaran a -80°C hasta su posterior análisis farmacocinético del fármaco.

### **Monitorización, determinación y cálculo de parámetros**

En cada uno de los animales de experimentación se monitoriza los siguientes parámetros que se describen a continuación:

- Parámetros de intercambio gaseoso: para la determinación de los parámetros de intercambio gaseoso se extraen muestras sangre arterial y venosa para determinar los parámetros  $P_{O_2}$ ,  $P_{CO_2}$ , pH, el exceso de bases (EB) y los niveles del ion bicarbonato ( $HCO_3^-$ ) y lactato.
- Parámetros hemodinámicos: se determina el electrocardiograma, TAM, PVC, flujo carotideo, GC continuo, el volumen sistólico (VS), la frecuencia cardiaca (FC), la resistencia vascular sistémica (SVR), el volumen global al final de la diástole (GEDV), el volumen de sangre intratorácico (ITBV), la variación del volumen sistólico (SVV), la variación de la presión del pulso (PPV), el agua pulmonar extravascular (EVLW), el índice de permeabilidad pulmonar vascular (PVPI), la fracción de eyección global (GEF), el índice de función cardiaca (CFI) y la velocidad de aumento de la presión arterial (dP/mx).

- Determinación del metabolismo del oxígeno: calculo del contenido arterial y venoso de oxígeno; consumo de oxígeno cerebral, y el aporte y extracción de oxígeno cerebral.
- La efectividad de la ventilación mecánica en cada animal se determina calculando los índices ventilatorios: el índice de oxigenación (IO), el índice de eficacia ventilatoria (IEV), la diferencia alveolo-arterial de  $O_2$  ( $A-aDO_2$ ) y la relación arterio-alveolar de  $O_2$  ( $a/ADO_2$ )
- Para la determinación de la función pulmonar se utiliza un módulo de espirometría adaptado al tubo endotraqueal que permite determinar el volumen corriente estandarizado ( $V_T$ ), la resistencia del sistema respiratorio ( $R$ ), la distensibilidad pulmonar dinámica estandarizada ( $C_{din}$ ).
- Oxigenación cerebral: La oxigenación cerebral se determina mediante espectroscopía cercana al infrarrojo (NIRS), de utilidad para medir el índice de oxigenación de los tejidos (TOI), el índice de hemoglobina tisular (nTHI), los cambios en la concentración de hemoglobina oxigenada ( $\Delta O_2Hb$ ), la hemoglobina desoxigenada ( $\Delta HHb$ ) y la hemoglobina total ( $\Delta CHb$ ) en tiempo real.

### **Grupos experimentales**

Los animales se distribuyen de forma aleatoria en grupos terapéuticos según los fármacos o técnicas a estudiar.

### **Registro de datos**

En todos los grupos controles y experimentales, se valora el efecto de las diferentes intervenciones experimentales en el intercambio gaseoso, parámetros hemodinámicos, metabolismo del oxígeno, índices ventilatorios,

mecánica pulmonar y oxigenación cerebral en los intervalos basal y 5, 15, 30 y cada 30 minutos hasta el final del procedimiento experimental.

### **Finalización del procedimiento y eutanasia**

Una vez finalizado el procedimiento experimental, todos los animales son sacrificados mediante la administración de una dosis de anestésico (propofol; 20 mg/kg; 10 mg/mL), un paralizante muscular (besilato de atracurio; 1,2 mg/kg; 10 mg/mL) y en último lugar un despolarizante de la contracción cardíaca (cloruro potásico; 200 mg/kg; 50 mg/mL).

### **Bibliografía**

- Rey-Santano C, Mielgo V, Valls-I-Soler A, Encinas E, Lukas JC, Vozmediano V, Suárez E. Evaluation of fentanyl disposition and effects in newborn piglets as an experimental model for human neonates. PLoS One. 2014;9(3):e90728.

## **8. MODELO EXPERIMENTAL DE ATRESIA DE ESÓFAGO EN ROEDORES INDUCIDA CON ADRIAMICINA**

Leopoldo Martínez Martínez

Servicio de Cirugía Pediátrica

Laboratorio de Malformaciones congénitas

Hospital Universitario La Paz

Red de Salud Materno Infantil y del Desarrollo

Revisado Marzo 2015

## **Animales de experimentación**

Se utilizan ratas de raza Wistar o Sprague-Dowley, en edad fértil. Las hembras deben pesar unos 250g y los machos han de ser de fertilidad probada. Todos se estabularán en las instalaciones del animalario, siendo aconsejable que lo estén al menos desde un mes antes.

## **Procedimientos**

Todos los procedimientos con animales se realizan siguiendo la normativa legal. El procedimiento experimental ha sido diseñado por personal homologado y es supervisado por el responsable del Área de Experimentación Animal, aprobado por el Comité de Ética en Investigación Animal del Centro.

## **Fecundación controlada**

- El día anterior al diagnóstico de embarazo los animales se disponen en jaulas adecuadas en número de 3 hembras por macho. Idealmente este apareamiento comenzará en horario de tarde, considerando las 00.00h de esa noche como día 0 de gestación.
- En la mañana siguiente, se tomará un frotis vaginal de cada una de las ratas para, bajo visión directa al microscopio de la extensión de dicho frotis, considerar el diagnóstico de embarazo. Este procedimiento se puede realizar con sedación en campana de halotano o similar, o sin sedación, pues el nivel de estrés para el animal es pequeño.
- Una vez demostrado dicho embarazo, cada rata preñada será etiquetada convenientemente y estabulada en jaula individual. En la etiqueta figurará claramente el día 0 de gestación y el experimento al que ha sido asignada.

- Tras ser adscrita de forma aleatoria al grupo experimental correspondiente, los días 7, 8 y 9 de gestación se procederá a la administración del teratógeno o del placebo.
- Para ello se sedará a la rata en campana de halotano y, una vez dormida, se introducirá por vía intraperitoneal a una dosis de 1,75mg/Kg la adriamicina diluido a la según recomendaciones de la preparación comercial o, en el grupo control, el suero fisiológico aislado.
- Tras ser de nuevo estabulada, la rata gestante esperará al momento establecido en el protocolo experimental para la cesárea.
- El día de la cesárea, la rata gestante se anestesiará en campana de halotano o similar y se rasurará el vello abdominal con rasuradora eléctrica o con crema depilatoria. Tras limpiar la zona, se procederá a la cesárea por laparotomía media y la exteriorización de los hemiúteros. Cada uno de los fetos será extraído de sus membranas y el cordón umbilical será cortado. Se procederá de forma inmediata a la introducción de los fetos en campana de halotano para su eutanasia.
- Una vez terminada la cesárea, se procederá a la eutanasia de la rata gestante mediante exanguinación por corte quirúrgico de la aorta abdominal.

### **Monitorización y registro de datos**

- En el caso de las ratas gestantes es conveniente monitorizar el peso en el momento de la administración del teratógeno o el excipiente (placebo) y en el día de la cesárea.
- Los fetos resultantes de la cesárea se deben inspeccionar para comprobar la presencia de malformaciones externas y también han de ser pesados. Tras su muerte, la comprobación de la presencia o no de una atresia de esófago

en el grupo al que se le administró adriamicina, debe hacerse mediante laparotomía transversa y esternotomía bajo control microquirúrgico.

### **Grupos terapéuticos**

Los animales se distribuyen de forma aleatoria en grupos terapéuticos según se les administre o no el teratógeno.

### **Finalización del experimento**

El experimento finaliza en el momento en que los fetos son procesados para el estudio pertinente protocolizado, recogiendo las muestras que se hayan previsto a tal efecto.

### **Bibliografía**

- Fragoso AC, Martinez L, Estevão-Costa J, Tovar JA. Abnormal Sonic hedgehog signaling in the lung of rats with esophageal atresia induced by adriamycin. *Pediatr Res.* 2014;76:355-62..
- Fragoso AC, Martinez L, Estevão-Costa J, Tovar JA. Maternal hyperthyroidism increases the prevalence of foregut atresias in fetal rats exposed to adriamycin. *Pediatr Surg Int.* 2014;30:151-7.
- Fragoso AC, Aras-Lopez R, Martinez L, Estevão-Costa J, Tovar JA. Abnormal control of lung branching in experimental esophageal atresia. *Pediatr Surg Int.* 2013;29:171-7.
- Hajduk P, May A, Puri P, Murphy P. The effect of adriamycin exposure on the notochord of mouse embryos. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2012;95:175-83.
- Xiaomei L, Aras-Lopez R, Martinez L, Tovar JA. Lung hypoplasia in rats with esophageal atresia and tracheo-esophageal fistula. *Pediatr Res.* 2012;71:235-40.

- Felix JF, de Jong EM, Torfs CP, de Klein A, Rottier RJ, Tibboel D. Genetic and environmental factors in the etiology of esophageal atresia and/or tracheoesophageal fistula: an overview of the current concepts. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2009;85:747-54.
- Calonge WM, Martinez L, Lacadena J, Fernandez-Dumont V, Matesanz R, Tovar JA. Expression of homeotic genes Hoxa3, Hoxb3, Hoxd3 and Hoxc4 is decreased in the lungs but not in the hearts of adriamycin-exposed mice. *Pediatr Surg Int.* 2007;23:419-24.
- Martinez L, Ceano-Vivas MD, Gonzalez-Reyes S, Hernandez F, Fernandez-Dumont V, Calonge WM, Ruiz E, Rodriguez JI, Tovar JA. Decrease of parafollicular thyroid C-cells in experimental esophageal atresia: further evidence of a neural crest pathogenic pathway. *Pediatr Surg Int.* 2005;21(3):175-9.
- Ioannides AS, Henderson DJ, Spitz L, Copp AJ. Role of Sonic hedgehog in the development of the trachea and oesophagus. *J Pediatr Surg.* 2003 ;38:29-36.
- Tugay M, Yildiz F, Utkan T, Ulak G, Gacar N, Erden F. Impaired esophageal reactivity in adriamycin-induced rat esophageal atresia: an in vitro study. *J Pediatr Surg.* 2001;36:1569-73.

## **9. MODELO EXPERIMENTAL DE MIELOMENINGOCELE EN ROEDORES INDUCIDO CON ACIDO RETINOICO**

Jose Luis Encinas Hernández

Leopoldo Martínez Martínez

Servicio de Cirugía Pediátrica

Laboratorio de Malformaciones Congénitas

Hospital Universitario La Paz

Red de Salud Materno Infantil y del Desarrollo

Revisado Marzo 2015

## **Animales de experimentación**

Se utilizan ratas de raza Wistar o Sprague-Dowley, en edad fértil. Las hembras deben pesar unos 250g y los machos han de ser de fertilidad probada. Todos se encontrarán estabulados en las instalaciones del animalario, siendo aconsejable que lo estén al menos desde un mes antes.

## **Procedimientos**

Todos los procedimientos con animales se realizan siguiendo la normativa legal. El procedimiento experimental ha sido diseñado por personal homologado y es supervisado por el responsable del Área de Experimentación Animal, aprobado por el Comité de Ética en Investigación Animal del Centro.

## **Fecundación controlada**

- El día anterior al diagnóstico de embarazo los animales se disponen en jaulas adecuadas en número de 3 hembras por macho. Idealmente este apareamiento comenzará en horario de tarde, considerando las 00.00h de esa noche como día 0 de gestación.
- En la mañana siguiente, se tomará un frotis vaginal de cada una de las ratas para, bajo visión directa al microscopio de la extensión de dicho frotis, considerar el diagnóstico de embarazo. Este procedimiento se puede realizar con sedación en campana de halotano o sin sedación, pues el nivel de estrés para el animal es pequeño.
- Una vez demostrado dicho embarazo, cada rata preñada será etiquetada convenientemente y estabulada en jaula individual. En la etiqueta figurará claramente el día 0 de gestación y el experimento al que ha sido asignada.

- Tras ser adscrita de forma aleatoria al grupo experimental correspondiente, el día 10 de gestación se procederá a la administración del teratógeno o del placebo.
- Para ello se sedará a la rata en campana de halotano y, una vez dormida, se introducirá por boca una sonda orogástrica. A través de ella se administrará bien el ácido retinoico a una dosis de 120mg/kg diluido en 1-2 cc de aceite de oliva, bien el aceite de oliva aislado.
- Tras ser de nuevo estabilada, la rata gestante esperará al momento establecido en el protocolo experimental para la cesárea.
- El día de la cesárea, la rata gestante se anestesiará en campana de halotano o similar y se rasurará el vello abdominal con rasuradora eléctrica o con crema depilatoria. Tras limpiar la zona, se procederá a la cesárea por laparotomía media y la exteriorización de los hemiúteros. Cada uno de los fetos será extraído de sus membranas y el cordón umbilical será cortado. Se procederá de forma inmediata a la introducción de los fetos en campana de halotano para su eutanasia.
- Una vez terminada la cesárea, se procederá a la eutanasia de la rata gestante mediante exanguinación por corte quirúrgico de la aorta abdominal.

### **Monitorización y registro de datos**

- En el caso de las ratas gestantes es conveniente monitorizar el peso en el momento de la administración del teratógeno o el excipiente (placebo) y en el día de la cesárea.
- Los fetos resultantes de la cesárea se deben inspeccionar para comprobar la presencia de mielomeningocele y otras malformaciones externas y también han de ser pesados.

## **Grupos terapéuticos**

Los animales se distribuyen de forma aleatoria en grupos terapéuticos según se les administre o no el teratógeno.

## **Finalización del experimento**

El experimento finaliza en el momento en que los fetos son procesados para el estudio pertinente protocolizado, recogiendo las muestras que se hayan previsto a tal efecto.

## **Bibliografía**

- Dionigi B, Ahmed A, Brazzo J 3rd, Connors JP, Zurakowski D, Fauza DO. Partial or complete coverage of experimental spina bifida by simple intra-amniotic injection of concentrated amniotic mesenchymal stem cells. *J Pediatr Surg.* 2015;50:69-73.
- Barbe MF, Adiga R, Gordiienko O, Pleshko N, Selzer ME, Krynska B. Micro-computed tomography assessment of vertebral column defects in retinoic acid-induced rat model of myelomeningocele. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2014;100:453-62.
- Watanabe M, Li H, Roybal J, Santore M, Radu A, Jo J, Kaneko M, Tabata Y, Flake A. A tissue engineering approach for prenatal closure of myelomeningocele: comparison of gelatin sponge and microsphere scaffolds and bioactive protein coatings. *Tissue Eng Part A.* 2011;17:1099-110.
- Tran PX, Au KS, Morrison AC, Fletcher JM, Ostermaier KK, Tyerman GH, Northrup H. Association of retinoic acid receptor genes with meningomyelocele. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2011;91:39-43.

- Watanabe M, Jo J, Radu A, Kaneko M, Tabata Y, Flake AW. A tissue engineering approach for prenatal closure of myelomeningocele with gelatin sponges incorporating basic fibroblast growth factor. *Tissue Eng Part A*. 2010;16:1645-55.
- Danzer E, Radu A, Robinson LE, Volpe MV, Adzick NS, Flake AW. Morphologic analysis of the neuromuscular development of the anorectal unit in fetal rats with retinoic acid induced myelomeningocele. *Neurosci Lett*. 2008;430:157-62.
- Quemelo PR, Lourenço CM, Peres LC. Teratogenic effect of retinoic acid in swiss mice. *Acta Cir Bras*. 2007;22:451-6.
- Danzer E, Schwarz U, Wehrli S, Radu A, Adzick NS, Flake AW. Retinoic acid induced myelomeningocele in fetal rats: characterization by histopathological analysis and magnetic resonance imaging. *Exp Neurol*. 2005;194:467-75.
- Yu J, Gonzalez S, Martinez L, Diez-Pardo JA, Tovar JA. Effects of retinoic acid on the neural crest-controlled organs of fetal rats. *Pediatr Surg Int*. 2003 ;19:355-8.
- Bitoh Y, Shimotake T, Sasaki Y, Iwai N. Development of the pelvic floor muscles of murine embryos with anorectal malformations. *J Pediatr Surg*. 2002;37:224-7.
- Diez-Pardo JA, Mariño JM, Baoquan Q, Delgado-Baeza E, Fernández A, Morales MC, Tovar JA. Neural tube defects: an experimental model in the foetal rat. *Eur J Pediatr Surg*. 1995;5:198-202.

## **10. MODELO EXPERIMENTAL DE HERNIA DIAFRAGMÁTICA CONGÉNITA EN ROEDORES INDUCIDA CON NITROFEN**

Leopoldo Martínez Martínez

Servicio de Cirugía Pediátrica

Laboratorio de Malformaciones Congénitas

Hospital Universitario La Paz

Red de Salud Materno Infantil y del Desarrollo

Revisado Marzo 2015

## **Animales de experimentación**

Se utilizan ratas de raza Wistar o Sprague-Dowley, en edad fértil. Las hembras deben pesar unos 250g y los machos han de ser de fertilidad probada. Todos se encontrarán estabulados en las instalaciones del animalario, siendo aconsejable que lo estén al menos desde un mes antes.

## **Procedimientos**

Todos los procedimientos con animales se realizan siguiendo la normativa legal. El procedimiento experimental ha sido diseñado por personal homologado y es supervisado por el responsable del Área de Experimentación Animal, aprobado por el Comité de Ética en Investigación Animal del Centro.

## **Fecundación controlada**

- El día anterior al diagnóstico de embarazo los animales se disponen en jaulas adecuadas en número de 3 hembras por macho. Idealmente este apareamiento comenzará en horario de tarde, considerando las 00.00h de esa noche como día 0 de gestación.
- En la mañana siguiente, se tomará un frotis vaginal de cada una de las ratas para, bajo visión directa al microscopio de la extensión de dicho frotis, considerar el diagnóstico de embarazo. Este procedimiento se puede realizar con sedación en campana de halotano o sin sedación, pues el nivel de estrés para el animal es pequeño.
- Una vez demostrado dicho embarazo, cada rata preñada será etiquetada convenientemente y estabulada en jaula individual. En la etiqueta figurará claramente el día 0 de gestación y el experimento al que ha sido asignada.

- Tras ser adscrita de forma aleatoria al grupo experimental correspondiente, el día 9,5 de gestación se procederá a la administración del teratógeno o del placebo.
- Para ello se sedará a la rata en campana de halotano y, una vez dormida, se introducirá por boca una sonda orogástrica. A través de ella se administrará bien el nitrofen a una dosis de 100mg/kg diluido en 1-2 cc de aceite de oliva, bien el aceite de oliva aislado.
- Tras ser de nuevo estabulada, la rata gestante esperará al momento establecido en el protocolo experimental para la cesárea.
- El día de la cesárea, la rata gestante se anestesiará en campana de halotano o similar y se rasurará el vello abdominal con rasuradora eléctrica o con crema depilatoria. Tras limpiar la zona, se procederá a la cesárea por laparotomía media y la exteriorización de los hemiúteros. Cada uno de los fetos será extraído de sus membranas y el cordón umbilical será cortado. Se procederá de forma inmediata a la introducción de los fetos en campana de halotano para su eutanasia.
- Una vez terminada la cesárea, se procederá a la eutanasia de la rata gestante mediante exanguinación por corte quirúrgico de la aorta abdominal.

### **Monitorización y registro de datos**

- En el caso de las ratas gestantes es conveniente monitorizar el peso en el momento de la administración del teratógeno o el excipiente (placebo) y en el día de la cesárea.
- Los fetos resultantes de la cesárea se deben inspeccionar para comprobar la presencia de malformaciones externas y también han de ser pesados. Tras su muerte, la comprobación de la presencia o no de una hernia

diafragmática en el grupo al que se le administró nitrofen, debe hacerse mediante laparotomía transversa bajo control microquirúrgico.

### **Grupos terapéuticos**

Los animales se distribuyen de forma aleatoria en grupos terapéuticos según se les administre o no el teratógeno.

### **Finalización del experimento**

El experimento finaliza en el momento en que los fetos son procesados para el estudio pertinente protocolizado, recogiendo las muestras que se hayan previsto a tal efecto.

### **Bibliografía**

- Kitano Y, Kanai M, Davies P, von Allmen D, Yang EY, Radu A, Kitano Y, AdzickNS, Flake AW. BAPS prize-1999: Lung growth induced by prenatal tracheal occlusion and its modifying factors: a study in the rat model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 2000;36:251-9.
- Greer JJ, Cote D, Allan DW, Zhang W, Babiuk RP, Ly L, Lemke RP, Bagnall K. Structure of the primordial diaphragm and defects associated with nitrofen-induced CDH. *J Appl Physiol* (1985). 2000;89:2123-9.
- 3: Migliazza L, Xia HM, Arnaiz A, Alvarez JI, Alfonso LF, Diez-Pardo JA, Valls i Soler A, Tovar JA. Prenatal dexamethasone rescues heart hypoplasia in fetal rats with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 2000 ;35:1757-61.
- Losada A, Tovar JA, Xia HM, Diez-Pardo JA, Santisteban P. Down-regulation of thyroid transcription factor-1 gene expression in fetal lung hypoplasia is restored by glucocorticoids. *Endocrinology.* 2000;141:2166-73.

- Greer JJ, Allan DW, Babiuk RP, Lemke RP. Recent advances in understanding the pathogenesis of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Pulmonol.* 2000;29:394-9.
- Keijzer R, Liu J, Deimling J, Tibboel D, Post M. Dual-hit hypothesis explains pulmonary hypoplasia in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia. *Am J Pathol.* 2000;156:1299-306..
- Migliazza L, Otten C, Xia H, Rodriguez JI, Diez-Pardo JA, Tovar JA. Cardiovascular malformations in congenital diaphragmatic hernia: human and experimental studies. *J Pediatr Surg.* 1999;34:1352-8.
- Migliazza L, Xia H, Alvarez JI, Arnaiz A, Diez-Pardo JA, Alfonso LF, Tovar JA. Heart hypoplasia in experimental congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 1999;34:706-10
- Losada A, Xia H, Migliazza L, Diez-Pardo JA, Santisteban P, Tovar JA. Lung hypoplasia caused by nitrofen is mediated by down-regulation of thyroid transcription factor TTF-1. *Pediatr Surg Int.* 1999;15:188-91.
- Tovar JA, Qi B, Diez-Pardo JA, Alfonso LF, Arnaiz A, Alvarez FJ, Valls-i-Soler A, Morreale de Escobar G. Thyroid hormones in the pathogenesis of lung hypoplasia and immaturity induced in fetal rats by prenatal exposure to nitrofen. *J Pediatr Surg.* 1997;32:1295-7.
- Yamataka T, Puri P. Increased intracellular levels of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in pulmonary endocrine cells in an experimental model of congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int.* 1996;11:448-52.
- Qi B, Diez-Pardo JA, Nistal M, Tovar JA. Testicular maldescent and maldevelopment in fetal rats prenatally exposed to nitrofen. *Pediatr Surg Int.*

1996 ;11:261-5.

- Baoquan Q, Diez-Pardo JA, Tovar JA. Intestinal rotation in experimental congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 1995;30:1457-62..
- Losty PD, Suen HC, Manganaro TF, Donahoe PK, Schnitzer JJ. Prenatal hormonal therapy improves pulmonary compliance in the nitrofen-induced CDH rat model. *J Pediatr Surg.* 1995;30:420-6.
- Alfonso LF, Vilanova J, Aldazabal P, Lopez de Torre B, Tovar JA. Lung growth and maturation in the rat model of experimentally induced congenital diaphragmatic hernia. *Eur J Pediatr Surg.* 1993;3:6-11.
- Wickman DS, Siebert JR, Benjamin DR. Nitrofen-induced congenital diaphragmatic defects in CD1 mice. *Teratology.* 1993;47:119-25.
- Tovar JA, Alfonso LF, Aldazabal P, Lopez de Torre B, Uriarte S, Vilanova J. The kidney in the fetal rat model of congenital diaphragmatic hernia induced by nitrofen. *J Pediatr Surg.* 1992;27:1356-60..
- Sluiter W, Bos AP, Silveri F, Tenbrinck R, Kraakslee R, Tibboel D, Koster JF, Molenaar JC. Nitrofen-induced diaphragmatic hernias in rats: pulmonary antioxidant enzyme activities. *Pediatr Res.* 1992;32:394-8.
- Tenbrinck R, Gaillard JL, Tibboel D, Kluth D, Lachmann B, Molenaar JC. Pulmonary vascular abnormalities in experimentally induced congenital diaphragmatic hernia in rats. *J Pediatr Surg.* 1992;27:862-5.
- Kluth D, Kangah R, Reich P, Tenbrinck R, Tibboel D, Lambrecht W. Nitrofen-induced diaphragmatic hernias in rats: an animal model. *J Pediatr Surg.* 1990;25:850-4.
- Iritani I. Experimental study on embryogenesis of congenital diaphragmatic hernia. *Anat Embryol (Berl).* 1984;169:133-9.

- Costlow RD, Manson JM. The heart and diaphragm: target organs in the neonatal death induced by nitrofen (2,4-dichlorophenyl-p-nitrophenyl ether). *Toxicology*.1981;20:209-27.

## **11. MODELO EXPERIMENTAL DE TRASPLANTE INTESTINAL EN RATAS**

Ane Miren Andrés Moreno

Leopoldo Martínez Martínez

Servicio de Cirugía Pediátrica

Laboratorio de Malformaciones Congénitas

Hospital Universitario La Paz

Red de Salud Materno Infantil y del Desarrollo

Revisado Marzo 2015

## **Animales de experimentación**

Se utilizan ratas de raza Wistar o Sprague-Dowley, en edad fértil. Las hembras deben pesar unos 250g y los machos han de ser de fertilidad probada. Todos se encontrarán estabulados en las instalaciones del animalario, siendo aconsejable que lo estén al menos desde un mes antes.

## **Procedimientos**

Todos los procedimientos con animales se realizan siguiendo la normativa legal. El procedimiento experimental ha sido diseñado por personal homologado y es supervisado por el responsable del Área de Experimentación Animal, aprobado por el Comité de Ética en Investigación Animal del Centro.

## **Fecundación controlada**

- El día anterior al diagnóstico de embarazo los animales se disponen en jaulas adecuadas con restricción de dieta a solamente líquidos, tanto para el donante como para el receptor.
- En la mañana siguiente, el animal donante se anestesiara en cámara de halotano o similar, manteniendo la anestesia general mediante mascarilla facial. Se practicará una laparotomía media y evisceración del paquete intestinal.
- El pedículo vascular arterial se disecará desde la arteria mesentérica superior hasta la aorta abdominal. Para el pedículo venoso se disecará la vena porta común. Todos estos procedimientos han de hacerse con control microquirúrgico.
- El injerto vascular será tomado desde al ángulo de Treitz hasta unos 3cm proximales a la válvula ileocecal.

- Una vez cortado el injerto se lavará con Ringer lactato con no más de 5cm de agua como nivel de presión, hasta obtener un efluente claro a través de la vena porta. La rata donante se sacrifica en este momento mediante exanguinación al cortar la aorta.
- El injerto se mantendrá en un recipiente con ringer lactato en cámara frigorífica a 4°C durante 1-2h hasta su implante.
- El procedimiento en la rata receptora se hará inicialmente de igual manera, procediendo a su anestesia general y mantenimiento como lo descrito. Una vez anestesiada, se canalizará una vena en la cola para la infusión de SSF a una dosis de 1-2 ml/kg/min.
- El intestino se eviscera y se extirpa desde unos 5cm distales al ángulo de Treitz hasta 5 cm proximal a la válvula ileocecal. Los vasos mesentéricos serán ligados con seda de 5/0 o coagulados con pinza bipolar si está disponible.
- Las anastomosis vasculares se harán con visión microquirúrgica y con hilo de sutura de 9/0. La arterial se realiza aorto-aórtica término-lateral a nivel infrarrenal. La venosa se hará porto-cava término-lateral también infrarrenal. En los casos de injerto ortotópico, dicha anastomosis venosa ha de realizarse porto-portal, lo que técnicamente es mucho más exigente.
- Una vez realizadas las anastomosis, se desclamparán los vasos, primero el venoso y luego el arterial, para comprobar la correcta perfusión del injerto.
- Finalmente se reconstruirá la continuidad intestinal mediante anastomosis término-terminal de los dos cabos intestinales con puntos sueltos de 8/0. Se puede considerar la realización de una ileostomía en el cabo distal si el diseño experimental así lo requiere.

- Una vez terminada la intervención, la rata trasplantada pasará a su jaula para despertar. Se ofrecerá dieta libre de líquido y sólido desde el primer momento a menos que el diseño experimental diga lo contrario.

### **Monitorización y registro de datos**

- En el caso de las dos ratas, se debe confirmar el peso para comprobar una proporcionalidad correcta. Dicho peso no debe variar más de un 10-15% de una a otra.
- La rata receptora debe monitorizarse durante la intervención para su frecuencia cardiaca si existe monitor adecuado. A partir del día siguiente, y siempre según el diseño experimental, se pesará, se controlará el volumen de líquido ingerido, la comida sólida restante y la medicación, que será administrada en función de nuevo del diseño.

### **Grupos terapéuticos**

Los animales se distribuyen de forma aleatoria en grupos terapéuticos según el diseño, siendo los grupos básicos aquellos que sufrirán rechazo por ausencia de medicación y otros en los que dicho rechazo se intentará modular con el uso de inmunosupresores.

### **Finalización del experimento**

El experimento finaliza en el momento en que las ratas receptoras son sacrificadas para la obtención de las muestras correspondientes.

### **Bibliografía**

- Technical aspects of experimental intestinal transplant. López-Fernández S, Hernández F, Hernández-Martín S, Barrena S, Wang Z, Zou W, Andrés AM, Encinas JL, Garriboli M, Largo C, López-Santamaría M, Tovar JA. *Cir Pediatr.* 2012;25:103-8.

- Hernández F, Zou Y, López G, Romero M, Martínez L, González-Reyes S, García A, Peña P, López Santamaría M, Tovar JA. Is portal venous outflow better than systemic venous outflow in small bowel transplantation? Experimental study in syngeneic rats. *J Pediatr Surg.* 2005;40:336-40.
- Okamoto T, Okamoto S, Fujimoto Y, Tabata Y, Uemoto S. Suppression of acute rejection by administration of prostaglandin E2 receptor subtype 4 agonist in rat organ transplantation models. *J Surg Res.* 2013;183:852-9
- Varga J, Tóth S, Staško P, Tóth S Jr, Bilecová-Rabajdová M, Ostró A, Veselá J. Intestinal ischemia-reperfusion injury - the histopathological status of remote vital organs in acute and subacute phases.. *Ann Transplant.* 2012;17:11-20.
- Wang H. Small animal models of xenotransplantation. *Methods Mol Biol.* 2012;885:125-53.
- Yang J, Li M, Zhang H, Hong L, Feng F, Pan F, Wang Y, Wang W. Application of a self-made swivel intravenous transfusion device in constructing allogenic small bowel transplantation rejection model in rats. *Transplant Proc.* 2009;41:4397-400.
- Camprodon RA, Bowles MJ An experimental technique to assess the immunologic consequences of 6.- segmental small bowel transplantation.. *Transplant Proc.* 2006;38:1853-4.
- Pirenne J, Kawai M. Tolerogenic protocols for intestinal transplantation. *Transpl Immunol.* 2004;13:131-7.
- Baláz P, Kudla M, Matia I, Froněk J, Ryska M. Model of small bowel transplantation with systemic venous drainage in rats. *Ann Transplant.* 2003;8:36-8.

- Nakao A, Tahara K, Inoue S, Tanaka N, Kobayashi E. Experimental models of small intestinal transplantation in rats: orthotopic versus heterotopic model. *Acta Med Okayama*. 2002;56:69-74.
- Meyer D, Thorwarth WM, Otto C, Gassel HJ, Timmermann W, Ulrichs K, Thiede A Orthotopic liver/small bowel transplantation in rats: a microsurgical model inducing tolerance.. *Microsurgery*. 2001;21:156-62.

## **12. MODELO EXPERIMENTAL DE PARADA CARDIACA ASFÍCTICA EN CERDOS**

Jorge López González

Blanca Toledo Del Castillo

Javier Urbano Villaescusa

Jesús López-Herce Cid

Servicio de Cuidados Intensivos Pediátricos

Hospital GU Gregorio Marañón. Madrid

Red de Salud Materno Infantil y del Desarrollo

Febrero 2009.

Revisado Febrero 2015

## **Animales de experimentación**

Se utilizan lechones de cerdos enanos de estirpe Maryland de 2 a 3 meses de edad, de entre 5 a 10 kg isogénicos para 3 loci del complejo mayor de histocompatibilidad.

Los animales se transportan desde la granja autorizada por la Comunidad de Madrid en la misma semana del experimento, permaneciendo estabulados en el animalario del pabellón de medicina y cirugía experimental 24 horas antes del experimento.

## **Procedimientos**

Todos los procedimientos con animales se realizan siguiendo la normativa legal. El procedimiento experimental ha sido diseñado por personal homologado y es supervisado por el responsable del Área de Experimentación Animal, aprobado por la Comisión de Investigación del Centro.

## **Anestesia y cirugía**

- Los animales permanecen 12 horas a dieta absoluta previamente al experimento. Se premedican con ketamina (15 mg/kg) y atropina (0.03 mg/kg) i.m.
- Posteriormente se introduce un catéter (24G) en la vena periférica de la oreja y se monitoriza el ECG y la pulsioximetría transcutánea.
- Se induce la anestesia con fentanilo (5 µg/kg), propofol (3 mg/kg) y atracurio (2.5 mg/kg). Tras preoxigenar ventilando con bolsa autoinflable y mascarilla, se realiza intubación orotraqueal con un tubo balonado (4-5 mm ID) y se conecta a un respirador convencional, con unos parámetros iniciales de VC: 10 ml/kg, FR: 20 rpm PEEP: 4-5 cmH<sub>2</sub>O, relación I:E: 1:2 y se ajusta

para mantener una EtCO<sub>2</sub> aprox. de 35 mmHg. La PIP suele alcanzar aproximadamente 20 cmH<sub>2</sub>O y la F<sub>i</sub>O<sub>2</sub>:0.3-0.4.

- Se conecta una pieza “en T” entre la tubuladura y el filtro humidificador para medir consumo calórico mediante calorimetría indirecta con el monitor Datex-Ohmeda®.
- Sedación: una vez iniciada la ventilación mecánica se mantiene una infusión continua de propofol (10 mg/kg/h, aproximadamente 5-6 ml/h) y otra de fentanilo (10 µg/kg/h) más atracurio (2,5 mg/kg/h), en suero glucosado al 5% aproximadamente a 5-6 ml/h.
- Se colocan dos sensores pediátricos de oximetría transcutánea INVOS 3100 (Somanetics®) en el cráneo y alternativamente a la zona renal-lumbar, hepática-subcostal o vesical para la medición continua de la oxigenación tisular.
- Canalización arterial: se canaliza la arteria femoral mediante disección o mediante punción directa con control ecográfico, para introducir un catéter (3 ó 5 Fr; PV2014L08, PiCCO Pulsion®), para la medición continua de la presión arterial, gasto cardiaco y la temperatura de la sangre. A través de este catéter, también se obtienen muestras de sangre para gases sanguíneos y equilibrio ácido-base.
- Canalización venosa central y gasto cardiaco: posteriormente, se coloca un catéter venoso en la vena femoral derecha (5,5F) para la medición de la presión venosa central y del gasto cardiaco y la extracción de muestras de sangre.

### **Monitorización y registro de datos**

- Se registran los siguientes datos: equilibrio ácido-base y gasometría (arterial y venosa: 0,2 ml para cada muestra), hemograma, bioquímica (función hepática, renal, ionograma, troponina, ácido láctico), y coagulación (10 ml en total), frecuencia cardiaca, tensión arterial (sistólica, diastólica y media), temperatura sanguínea, índices de oxigenación tisular cerebral y esplácnico, calorimetría indirecta (consumo de O<sub>2</sub>, producción de CO<sub>2</sub>, coeficiente respiratorio y consumo calórico), frecuencia respiratoria, volumen corriente, y CO<sub>2</sub> espirado. El gasto cardiaco se mide mediante el sistemas PiCCO con 5 ml de suero frío para la termodilución y se registran los valores hemodinámicos obtenidos (gasto e índice cardíacos, índice de resistencias vasculares sistémicas, índice de sangre intratorácica, índice de volumen sistólico, índice de variabilidad sistólica, volumen global telediastólico, índice de agua extravascular pulmonar, índice de función cardiaca y la contractilidad). Se realiza microcirculación sublingual basal, al minuto y 5 minutos de la desconexión de la ventilación mecánica y en el caso de que exista recuperación de la circulación espontánea tras la misma y tras 30 y 60 minutos.
- Los datos se obtienen a los 30 minutos de la fase quirúrgica (medición en situación basal), cada 5 minutos tras la desconexión del respirador, cada 3 minutos durante la reanimación, y en caso de recuperación de la circulación espontánea cada 5 minutos durante los 15 primeros minutos de recuperación, a los 30 y a los 60 minutos.

### **Grupos terapéuticos**

Los animales se distribuyen de forma aleatoria en grupos terapéuticos según los fármacos o técnicas a estudiar.

## **Inducción de la parada cardiaca**

Para inducir la asfixia se administra una dosis extra de fentanilo y atracurio y se desconecta el respirador. En el momento de la desconexión se cronometra el tiempo para determinar el momento de las mediciones.

## **Reanimación cardiopulmonar**

- Las maniobras de reanimación cardiopulmonar no se inician hasta que el animal presenta ausencia de pulso arterial (tensión arterial media menor de 25), y siempre que hayan transcurrido como mínimo 10 minutos desde la desconexión del respirador. A los 5 minutos de la desconexión, se realiza toma de constantes y medición de microcirculación sublingual.
- Se conecta de nuevo el respirador con los parámetros determinados previamente y con FiO<sub>2</sub> 100 % y se inicia masaje cardiaco continuo a 100 lpm (ver apartado de masaje cardiaco).
- Se siguen las normas de reanimación cardiopulmonar pediátrica avanzada del Grupo Español de RCP pediátrica y Neonatal y del Consejo Europeo de Resucitación.
- Cada dos minutos se comprueba la recuperación de la circulación espontánea suspendiendo transitoriamente el masaje para verificar el pulso arterial carotideo, el ritmo ECG, la TA y la CO<sub>2</sub> espirada.
- Cada 3 minutos se administra la medicación correspondiente al grupo terapéutico.
- El masaje y la administración de fármacos se suspenden si el animal recupera el pulso arterial carotídeo por encima de 60 lpm y/o la TAS espontánea es mayor de 50 mmHg.

- Se toman constantes cada 3 minutos y se extraen analíticas cada 6 minutos.

### **Masaje cardiaco**

Dado que el animal tiene un tórax en forma de quilla, es preciso dar el masaje cardiaco sobre la parrilla costal izquierda, en la zona que correspondería a la pared del ventrículo (craneal a la zona donde se palpa el latido de la punta cardiaca).

Disponemos de dos posibilidades para realizar compresiones torácicas.

- Manual: se realiza masaje cardiaco por parte de los reanimadores, manteniéndose una frecuencia de 100 lpm (controlando la frecuencia con un metrónomo y las variables con la diferente monitorización, el monitor de PiCCO, el ECG, etc), comprimiendo 1/3 del diámetro anteroposterior del tórax.
- Mecánico: se puede usar un sistema de compresión mecánica (Thumper) donde podremos fijar la frecuencia de masaje a 100 lpm y la profundidad para que deprima 1/3 del diámetro anteroposterior del tórax. La profundidad de las compresiones se debe ir aumentando de manera progresiva durante el primer minuto de reanimación y tras la primera reevaluación ajustar la altura del pistón dada la remodelación del tórax con las compresiones. El sistema debe estar completamente apoyado sobre una superficie estable y correctamente fijado.

### **Mediciones postrecuperación de la circulación espontánea (RCE)**

- Se toman constantes y se realizan analíticas cada 5 minutos durante los 15 primeros minutos después de la recuperación de la circulación espontánea. Posteriormente a los 30 y 60 minutos.
- Se realiza microcirculación sublingual tras la RCE y a los 30 y 60 minutos.

## **Finalización del experimento**

El experimento finaliza:

- a) Si no se consigue la recuperación de la circulación espontánea tras 24 minutos de RCP.
- b) A la hora de la recuperación de la circulación espontánea. En este caso al finalizar el experimento los animales se sacrifican con una dosis supraanestésica de propofol, fentanilo y 2 mEq/kg de cloruro potásico intravenoso.

## **Bibliografía**

- Voelckel WG, Lurie KG, McKnite S, Zielinski T, Lindstrom P, Peterson C, Krismer AC, Lindner KH, Wenzel V. Comparison of epinephrine and vasopressin in a pediatric porcine model of asphyxial cardiac arrest. *Crit Care Med.* 2000;28:3777-83.
- Mann K, Berg RA, Nadkarni V. Beneficial effects of vasopressin in prolonged pediatric cardiac arrest: a case series. *Resuscitation.* 2002;52:149-56.
- Mayr VD, Wenzel V, Voelckel WG, Krismer AC, Mueller T, Lurie KG, Lindner KH. Developing a vasopressor combination in a pig model of adult asphyxial cardiac arrest. *Circulation.* 2001;104:1651-6.
- Prengel AW, Lindner KH, Keller A, Lurie KG. Cardiovascular function during the postresuscitation phase after cardiac arrest in pigs: a comparison of epinephrine versus vasopressin. *Crit Care Med.* 1996;24:2014-9.
- Rupérez M, López-Herce J, García C, Sánchez C, García E, Vigil D. Comparison Between Cardiac Output Measured by the Pulmonary Arterial Thermodilution Technique and that Measured by the Femoral Arterial

Thermodilution Technique in a Pediatric Animal Model. *Pediatr Cardiol.* 2004;25:119-23.

- Prengel AW, Lindner KH, Wenzel V, Tugtekin I, Anhaupl T. Splanchnic and renal blood flow after cardiopulmonary resuscitation with epinephrine and vasopressin in pigs. *Resuscitation.* 1998;38:19-24.
- Castellanos Ortega A, Rey Galán C, Carrillo Álvarez A, López-Herce Cid J, Delgado Domínguez MA. Reanimación cardiopulmonar avanzada en pediatría. *An Pediatr* 2006;65:342-63.

### **13. MODELO EXPERIMENTAL DE SHOCK HIPOVOLÉMICO POR HEMORRAGIA CONTROLADA EN CERDOS PEDIÁTRICOS**

Javier Urbano Villaescusa

Jesús López-Herce Cid

Servicio de Cuidados Intensivos Pediátricos

Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid

Red de Salud Maternoinfantil y Del Desarrollo

Abril 2015

## **Animales de experimentación**

Se utilizan lechones de cerdos enanos de estirpe Maryland de 2 a 3 meses de edad, de entre 5 a 10 kg isogénicos para 3 loci del complejo mayor de histocompatibilidad.

Todos los procedimientos con animales se realizan siguiendo la normativa legal.

Los animales se transportan desde la granja autorizada por la Comunidad de Madrid en la misma semana del experimento, permaneciendo estabulados en el animalario del pabellón de medicina y cirugía experimental 24 horas antes del experimento.

El procedimiento experimental ha sido diseñado por personal homologado y es supervisado por el responsable del área de experimentación animal y aprobado por la Comisión de Investigación del centro.

Una vez finalizados los experimentos, los animales son sacrificados mediante una dosis supraanestésica de propofol y fentanilo y cloruro potásico i.v.

## **Anestesia y cirugía**

- Los animales permanecen 12 horas a dieta absoluta previamente al experimento. Se premedican con ketamina (15 mg/kg) y atropina (0,03 mg/kg) i.m. Posteriormente se introduce un catéter (24G) en la vena periférica de la oreja y se monitoriza el ECG y la pulsioximetría transcutánea. Se induce la anestesia con fentanilo (5 µg/kg), propofol (3 mg/kg) y atracurio (2,5 mg/kg).
- Intubación y ventilación mecánica: tras preoxigenar ventilando con bolsa autoinflable y mascarilla, se realiza intubación orotraqueal con un tubo balonado (4,5 mm ID) y se conectan a un respirador con unos parámetros

iniciales de volumen corriente (VC): 10-12 ml/kg, frecuencia respiratoria (FR): 20 rpm; presión espiratoria final (PEEP): 2-3 cmH<sub>2</sub>O, relación inspiración: espiración (I:E): 1:2. El (VC) se ajusta para mantener una CO<sub>2</sub> espirada (EtCO<sub>2</sub>) aproximada de 35 mmHg. y la F<sub>I</sub>O<sub>2</sub> entre 0,25 y 0,35. Se conecta una pieza “en T” entre la tubuladura y el filtro humidificador para medir consumo calórico y los parámetros de ventilación mediante calorimetría indirecta con el monitor Datex-Ohmeda.

- Sedoanalgesia de mantenimiento: una vez iniciada la ventilación mecánica se mantiene una infusión continua de propofol (10 mg/kg/h, aproximadamente 0,5 ml/kg/h), y una de fentanilo (10 µg/kg/h) más atracurio (2,5 mg/kg/h), en suero glucosado al 5%, por la misma vía periférica de la oreja. Algunos autores disminuyen las perfusiones de sedoanalgesia una vez finalizada la fase quirúrgica para evitar amortiguar la respuesta fisiológica a la hemorragia.
- Fluidoterapia basal: desde que se canaliza la vía central se inicia fluidoterapia con suero glucosado e iones para cubrir las necesidades basales y las pérdidas insensibles (40 ml/h).
- Se puede introducir un catéter de tonometría gástrica hasta el estómago a través de un tubo endotraqueal de 5 mm ID colocado en el esófago, y se conecta al módulo de tonometría del monitor Datex Ohmeda.
- Se colocan dos sensores pediátricos de oximetría transcutánea INVOS 3100 (Somanetics®) sobre la piel rasurada: uno en el cráneo (a 0,5-1 cm de la línea media) y otro hepática-subcostal o vesical para la medición continua de la oxigenación tisular.

- Flujo sanguíneo cutáneo: se coloca un sensor de doppler sobre la pared abdominal para medir el flujo sanguíneo cutáneo.
- Canalizaciones vasculares: tras administrar una dosis de fentanilo (5 mcg/kg) y atracurio (2,5 mg/kg) se realizan las siguientes canalizaciones vasculares:
  - Canalización arterial para medición de la presión arterial y gasto cardiaco: se aísla la arteria femoral mediante disección o se canaliza guiado por ecografía, para introducir un catéter (3 ó 5 F; PV2014L08, PiCCO Pulsion®), para la medición continua de la presión arterial, gasto cardiaco y la temperatura de la sangre. A través de este catéter, también se obtienen muestras de sangre para gases sanguíneos y equilibrio ácido-base.
  - Canalización venosa central: se canaliza la vena femoral contralateral o la vena yugular externa o interna para realizar la extracción de sangre, la expansión con fluidos, la administración de las perfusiones de sedoanalgesia y fluidoterapia y la administración de fármacos, y la medición de la saturación venosa central continua (Vigileo®, Edwards Lifescience).
  - Se puede valorar colocar un introductor de 6 F en la vena femoral derecha o en la yugular para introducir un catéter de Swan Ganz de 5,5 F en la arteria pulmonar para medición de gasto cardiaco y presión de enclavamiento pulmonar.
  - Canalización venosa yugular: se puede valorar también insertar un catéter en la vena yugular interna derecha con dirección cefálica mediante disección, si es preciso obtener muestras de sangre venosa del bulbo de la yugular.

- Flujo carotídeo: se realiza una incisión vertical paralela a la tráquea, guiándose por la palpación del latido carotídeo. Se disecciona la arteria carótida y se coloca un sensor de flujo doppler de tamaño adecuado. Se puede infundir suero salino para mejorar la lectura.
- Realización de una talla vesical y colocación de sonda urinaria si se requiere medir diuresis.

### **Método de producción del shock**

Para inducir el shock hipovolémico, se extraen de forma continua una cantidad fija (30-40 ml/kg) de sangre en 30 minutos, aspirando con una jeringa de 20 ml por la luz distal del catéter venoso central.

### **Medición de parámetros y analíticas**

- Momento de medición. Los datos y analíticas se obtienen tras la fase quirúrgica (basal), al finalizar la hipovolemia (extracción), 30 minutos tras la extracción (estabilización), al finalizar la infusión (expansión), y 30, 60, 90 y/o 120 minutos tras finalizar la infusión (observación), y tras 24 a 48 horas si se realiza estudio de supervivencia.
- Medición de parámetros
  - Hemodinámicos: frecuencia cardiaca, tensión arterial (sistólica, diastólica y media), presión venosa central, flujo carotídeo, Se mide el gasto cardiaco mediante los sistemas PiCCO y Swan Ganz, con dos inyecciones de 5 ml de suero frío para la termodilución y se registra la media de los valores hemodinámicos obtenidos (gasto e índice cardiacos, índice de resistencias vasculares sistémicas y pulmonares, índice de sangre intratorácica, índice de volumen sistólico, índice de variabilidad

sistólica, volumen global telediastólico, índice de agua extravascular pulmonar índice de función cardiaca y la contractilidad).

- Temperatura sanguínea.
- Perfusión tisular. índices de oxigenación tisular cerebral y esplácnico, tonometría gástrica (CO<sub>2</sub> y pH mucoso intragástrico), flujo tisular cutáneo.
- Microcirculación sublingual: mediante el sistema de microscopía de campo oscuro lateral, en la región sublingual. Se graban 5 secuencias de 10 segundos en la fase basal, previo a la expansión, y 30 o 60 minutos tras el final de la expansión.
- Calorimetría indirecta (consumo de O<sub>2</sub>, producción de CO<sub>2</sub>, coeficiente respiratorio y consumo calórico).
- Respiratorios: frecuencia respiratoria, volumen corriente, y CO<sub>2</sub> espirado.
- Analíticas: se realizan las siguientes analíticas:
  - Equilibrio ácido-base y gasometría (arterial, venosa y del bulbo yugular: 0,2 ml para cada muestra),
  - Hemograma.
  - Bioquímica: función hepática, ionograma, ácido láctico.
  - Función renal: diuresis y urea, creatinina y NGAL en sangre y orina: basal, previo a la expansión, al final del periodo de observación.
  - Coagulación:
  - Marcadores de daño endotelial, inflamación y muerte celular: syndecan-1, TNF- $\alpha$ , sVCAM-1, IL-6 (tubo EDTA); IL-8 (suero). Basal, previo a la expansión, al final del periodo de observación.
- Histología: se puede valorar realizar un análisis histológico, especialmente si se plantea un periodo de supervivencia del animal de 72 h. Se pueden

recoger muestras de pulmón, riñón, intestino, hígado y comparar el daño mediante puntuaciones de 0-4 según la apariencia de gravedad del tejido, con técnicas de fijación y tinción básicas como hematoxilina-eosina.

### **Tratamiento y periodos de observación**

- Para que se tolere un shock grave puede ser necesario aumentar la FiO<sub>2</sub> a concentraciones elevadas de 60-100%.
- Tipo y dosis de tratamiento: se decide el tipo de tratamiento líquido para la expansión y/o fármacos vasoactivos que se va a emplear y se aleatorizan siguiendo una tabla de aleatorización: por ejemplo, suero salino fisiológico, suero salino hipertónico (3%) ó suero salino hipertónico (3%) más albúmina humana (5%), sangre, o terlipresina (15 µg/kg). En general si se emplea un cristaloides se infunden 30-40 ml/kg, si se emplea un coloide 15 ml/kg, o pequeñas cantidades de coloide hipertónico (4 ml/kg) seguidas de transfusiones o cristaloides.
- Ritmo de infusión del líquido: 1-2 ml/kg/min.
- Periodos de observación: para poder valorar el efecto de la hemorragia y el del tratamiento hay que establecer periodos de observación sin realizar intervenciones terapéuticas (tras el inicio de la hemorragia, tras el tratamiento inicial y tras el tratamiento secundario). Estos periodos de observación variarán según el protocolo de estudio entre 30 y 120 minutos

### **Bibliografía**

- Chiara O, Pelosi P, Brazi L, et al. Resuscitation from hemorrhagic shock: experimental model comparing normal saline, dextran, and hypertonic saline solutions. Crit Care Med. 2003;31:1915-22.

- Watters JM, Tieu BH, Differding JA. A single bolus of 3% hypertonic saline with 6% dextran provides optimal initial resuscitation after uncontrolled hemorrhagic shock. *J Trauma* 2006;61:75-81.
- Rocha e Silva R, Caneo L, Lourenco D, et al. First Use of Hypertonic Saline Dextran in Children: A Study in Safety and Effectiveness for Atrial Septal Defect Surgery Shock. 2003;20:427-30.
- Schroth M, Planck C, Meisner U, et al. Hypertonic-hyperoncotic solutions improve cardiac function in children after open-heart surgery. *Pediatrics* 2006;118:76-84.
- Reuter DA, Kirchner A, Felbinger TW, et al. Usefulness of left ventricular stroke volume variation to assess fluid responsiveness in patients with reduced cardiac function. *Crit Care Med.* 2003;31:1399-404.
- Berlman GJ, Groehler KE, Lazon V, et al. Near-infrared spectroscopy measurement of regional tissue oxyhemoglobin saturation during hemorrhagic shock. *Shock* 1999;12:196-200
- Rupérez M, López-Herce J, García C, Sánchez C, García E, Vigil D. Comparison Between Cardiac Output Measured by the Pulmonary Arterial Thermodilution Technique and that Measured by the Femoral Arterial Thermodilution Technique in a Pediatric Animal Model. *Pediatr Cardiol.* 2004;25:119-23.
- López-Herce J, Rupérez M, Sánchez C, García C, García E. Haemodynamic response to acute hypovolaemia, rapid volume expansion and adrenaline administration in an infant animal model. *Resuscitation* 2006;68:259-65.

- Urbano J, López-Herce J, Solana MJ, del Castillo J, Botrán M, Bellón JM. Comparison of normal saline, hypertonic saline and hypertonic saline colloid resuscitation fluids in an infant animal model of hypovolemic shock. *Resuscitation* 2012; 83:1159-65.
- Urbano J, González R, López J, Solana MJ, Bellón JM, Botrán M, García A, Fernández SN, López-Herce J. Comparison of Normal Saline, Hypertonic Saline Albumin and Terlipressin plus Hypertonic Saline Albumin in an Infant Animal Model of Hypovolemic Shock. *PLoS One*. 2015;10:e0121678.

## **14. MODELO EXPERIMENTAL DE SHOCK HIPOVOLÉMICO POR HEMORRAGIA NO CONTROLADA EN CERDOS PEDIÁTRICOS**

Javier Urbano Villaescusa

Rafael González

Jesús López-Herce Cid

Servicio de Cuidados Intensivos Pediátricos

Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid

Red de Salud Maternoinfantil y Del Desarrollo

Abril 2015

## **Animales de experimentación**

Se utilizan lechones de cerdos enanos de estirpe Maryland de 2 a 3 meses de edad, de entre 5 a 10 kg isogénicos para 3 loci del complejo mayor de histocompatibilidad.

Todos los procedimientos con animales se realizan siguiendo la normativa legal.

Los animales se transportan desde la granja autorizada por la Comunidad de Madrid en la misma semana del experimento, permaneciendo estabulados en el animalario del pabellón de medicina y cirugía experimental 24 horas antes del experimento.

El procedimiento experimental ha sido diseñado por personal homologado y es supervisado por el responsable del área de experimentación animal y aprobado por la Comisión de Investigación del centro.

Una vez finalizados los experimentos, los animales son sacrificados mediante una dosis supraanestésica de propofol y fentanilo y 2 mEq/kg de cloruro potásico i.v.

## **Anestesia y cirugía**

- Los animales permanecen 12 horas a dieta absoluta previamente al experimento. Se premedican con ketamina (15 mg/kg) y atropina (0,03 mg/kg) i.m. Posteriormente se introduce un catéter (24G) en la vena periférica de la oreja y se monitoriza el ECG y la pulsioximetría transcutánea. Se induce la anestesia con fentanilo (5 µg/kg), propofol (3 mg/kg) y atracurio (2,5 mg/kg).
- Intubación y ventilación mecánica: tras preoxigenar ventilando con bolsa autoinflable y mascarilla, se realiza intubación orotraqueal con un tubo

balonado (4,5 mm ID) y se conectan a un respirador con unos parámetros iniciales de volumen corriente (VC): 10-12 ml/kg, frecuencia respiratoria (FR): 20 rpm; presión espiratoria final (PEEP): 2-3 cmH<sub>2</sub>O, relación inspiración: espiración (I:E): 1:2. El (VC) se ajusta para mantener una CO<sub>2</sub> espirada (EtCO<sub>2</sub>) aproximada de 35 mmHg. y la F<sub>i</sub>O<sub>2</sub> entre 0,25 y 0,35. Se conecta una pieza “en T” entre la tubuladura y el filtro humidificador para medir consumo calórico y los parámetros de ventilación mediante calorimetría indirecta con el monitor Datex-Ohmeda.

- Sedoanalgesia de mantenimiento: una vez iniciada la ventilación mecánica se mantiene una infusión continua de propofol (10 mg/kg/h, aproximadamente 0,5 ml/kg/h), y una de fentanilo (10 µg/kg/h) más atracurio (2,5 mg/kg/h), en suero glucosado al 5% aproximadamente a 0,5 ml/kg/h, por la misma vía periférica de la oreja. Algunos autores disminuyen las perfusiones de sedoanalgesia una vez finalizada la fase quirúrgica para evitar amortiguar la respuesta fisiológica a la hemorragia.
- Fluidoterapia basal: desde que se canaliza la vía central se inicia fluidoterapia con suero glucosado e iones para cubrir las necesidades basales y las pérdidas insensibles (40 ml/h).
- Se puede introducir un catéter de tonometría gástrica hasta el estómago a través de un tubo endotraqueal de 5 mm ID colocado en el esófago, y se conecta al módulo de tonometría del monitor Datex Ohmeda.
- Se colocan dos sensores pediátricos de oximetría transcutánea INVOS 3100 (Somanetics®) sobre la piel rasurada: uno en el cráneo (a 0,5-1 cm de la línea media) y otro hepática-subcostal para la medición continua de la oxigenación tisular.

- Flujo sanguíneo cutáneo: se coloca un sensor de doppler sobre la pared abdominal para medir el flujo sanguíneo cutáneo.
- Canalizaciones vasculares: tras administrar una dosis de fentanilo (5 mcg/kg) y atracurio (2,5 mg/kg) se realizan las siguientes canalizaciones vasculares:
- Canalización arterial para medición de la presión arterial y gasto cardiaco: se aísla la arteria femoral mediante disección o se canaliza guiado por ecografía, para introducir un catéter (3 ó 5 F; PV2014L08, PiCCO Pulsion®), para la medición continua de la presión arterial, gasto cardiaco y la temperatura de la sangre. A través de este catéter, también se obtienen muestras de sangre para gases sanguíneos y equilibrio ácido-base.
- Canalización venosa central: se canaliza la vena femoral contralateral o la vena yugular externa o interna para realizar la extracción de sangre, la expansión con fluidos, la administración de las perfusiones de sedoanalgesia y fluidoterapia y la medición de saturación venosa central continua.
- Se puede valorar colocar un introductor de 6F en la vena femoral derecha o en la yugular para introducir un catéter de Swan Ganz de 5,5F en la arteria pulmonar para medición de gasto cardiaco y presión de enclavamiento pulmonar.
- Canalización venosa yugular: se puede valorar también insertar un catéter en la vena yugular interna derecha con dirección cefálica mediante disección, si es preciso obtener muestras de sangre venosa del bulbo de la yugular.
- Flujo carotídeo: se realiza una incisión vertical paralela a la tráquea, guiándose por la palpación del latido carotídeo. Se disecciona la arteria carótida

y se coloca un sensor de flujo doppler de tamaño adecuado. Se puede infundir suero salino para mejorar la lectura.

- Flujo arterial abdominal: si se realiza laparotomía para provocar el sangrado, se pueden colocar sondas para medir el flujo doppler en la aorta, arteria renal, etc. Se puede colocar un sensor de flujo a nivel proximal y otro a nivel distal de la arteria que va a sangrar, y la diferencia de flujos sirve para calcular el volumen real de sangrado.
- Realización de una talla vesical y colocación de sonda urinaria si se requiere medir diuresis.

### **Métodos de producción del shock**

Se han descrito dos modelos de hemorragia no controlada: con laceración de víscera (hígado) o con laceración (o sección completa) arterial. El primer tipo presenta menor mortalidad, un shock menos rápido, pero con mayor variabilidad entre los sujetos. En el segundo tipo el shock es muy grave (en 1-2 minutos la tensión arterial media (TAM) puede disminuir a 25 mmHg, situación próxima a la parada cardiaca), con alta letalidad y menor heterogeneidad.

- Laceración hepática: se realiza una laparotomía media, se localiza el lóbulo derecho del hígado y se realiza una incisión con forma de H mayúscula de aproximadamente 6 cm en horizontal y 2 cm en vertical a cada lado, de unos 2 cm de profundidad. Se repasa la incisión realizando disección roma con los dedos. El abdomen queda abierto. A los 30 minutos se puede llegar a una TAM 20 mmHg y una disminución de la FC del 30% del valor basal. Tras la resucitación inicial con fluidos o fármacos (imitando la fase prehospitalaria), si interesa que el estudio continúe (imitando la fase hospitalaria) se puede controlar el sangrado taponando o reparando la incisión, y trasfundir

hemoderivados y otros fluidos para estabilizar al sujeto y que tolere un periodo de observación de 60 a 120 min.

- Laceración arterial: se realiza una laparotomía media. Se aparta el intestino cuidadosamente y se localiza a nivel retroperitoneal la arteria ilíaca común derecha a su salida de la aorta. También se puede realizar a nivel aórtico infrarrenal. Se disecciona el vaso y se enrolla un hilo cortante (*cutting suture braided #0 silk; Ethicon, Somerville, NJ*). de manera que complete una vuelta entera alrededor del vaso. Hay que pasar dos veces el hilo por la cara posterior de la arteria para que la vuelta sea completa. Los cabos se exteriorizan y se cierra la cavidad abdominal con cuidado de que quede bien sellada. Para provocar la laceración arterial se tracciona de los cabos con un movimiento de sierra, para seccionar por completo la arteria.

Este modelo produce un shock muy grave en menos de 5 minutos que suele ser letal a pesar de la infusión de fluidos. Se puede comparar posteriormente el tiempo de supervivencia, el volumen de sangrado y los valores hemodinámicos y de perfusión. Cuando el sujeto fallece se debe acceder rápidamente a la cavidad abdominal y ligar el vaso para que deje de sangrar, y poder comparar el volumen de sangrado.

Se puede realizar una variante de este modelo sin provocar una sección completa de la arteria, sino sólo una laceración, dando un punto de sutura en la arteria con profundidad suficiente como para atravesar por completo la pared del vaso, y dejando 3-4 mm de separación entre el cabo del hilo que entra y el que sale del vaso. Ambos cabos se exteriorizan y se tracciona de ellos para provocar la laceración arterial.

### **Medición de parámetros y analíticas**

- Momento de medición. Los datos y analíticas se obtienen tras la fase quirúrgica (basal), antes de iniciar el tratamiento (shock), al finalizar la infusión (expansión), y 30, 60, 90 y/o 120 minutos tras finalizar la infusión (observación), y tras 24 a 48 horas si se realiza estudio de supervivencia.
- Medición de parámetros
  - Hemodinámicos: frecuencia cardiaca, tensión arterial (sistólica, diastólica y media), presión venosa central, flujo carotídeo, Se mide el gasto cardiaco mediante los sistemas PiCCO y Swan Ganz, con 5 ml de suero frío para la termodilución y se registran los valores hemodinámicos obtenidos (gasto e índice cardiacos, índice de resistencias vasculares sistémicas y pulmonares, índice de sangre intratorácica, índice de volumen sistólico, índice de variabilidad sistólica, volumen global telediastólico, índice de agua extravascular pulmonar índice de función cardiaca y la contractilidad).
  - Temperatura sanguínea.
  - Perfusión tisular. índices de oxigenación tisular cerebral y esplácnico, tonometría gástrica (CO<sub>2</sub> y pH mucoso intragástrico), flujo tisular cutáneo.
  - Microcirculación sublingual: mediante el sistema de microscopía de campo oscuro lateral, en la región sublingual. Se graban 5 secuencias de 10 segundos en la fase basal, previo a la expansión, y 30 o 60 minutos tras el final de la expansión.
  - Calorimetría indirecta (consumo de O<sub>2</sub>, producción de CO<sub>2</sub>, coeficiente respiratorio y consumo calórico).
  - Respiratorios: frecuencia respiratoria, volumen corriente, y CO<sub>2</sub> espirado.
- Analíticas: se realizan las siguientes analíticas:

- Equilibrio ácido-base y gasometría (arterial, venosa y del bulbo yugular: 0,2 ml para cada muestra),
- Hemograma.
- Bioquímica: función hepática, ionograma, ácido láctico.
- Función renal: diuresis y urea, creatinina y NGAL en sangre y orina: basal, previo a la expansión, al final del periodo de observación.
- Coagulación:
- Marcadores de daño endotelial, inflamación y muerte celular: syndecan-1, TNF- $\alpha$ , sVCAM-1, IL-6 (tubo EDTA); IL-8 (Suero). Basal, previo a la expansión, al final del periodo de observación.
- Volumen o peso del sangrado a la cavidad abdominal: mediante un aspirador de secreciones se aspira la sangre en la cavidad. Los coágulos de sangre se deben retirar a mano y también pesarlos tras el sacrificio del animal.
- Histología: se puede valorar realizar un análisis histológico, especialmente si se plantea un periodo de supervivencia del animal de 72 h. Se pueden recoger muestras de pulmón, riñón, intestino, hígado y comparar el daño mediante puntuaciones de 0-4 según la apariencia de gravedad del tejido, con técnicas de fijación y tinción básicas como hematoxilina-eosina.

### **Tratamiento y periodos de observación**

- Para que se tolere un shock grave puede ser necesario aumentar la FiO<sub>2</sub> a concentraciones elevadas de 60-100%.
- Tipo y dosis de tratamiento: se decide el tipo de tratamiento líquido para la expansión y/o fármacos vasoactivos que se va a emplear y se aleatorizan siguiendo una tabla de aleatorización: por ejemplo, suero salino fisiológico,

suero salino hipertónico (3%) ó suero salino hipertónico (3%) más albúmina humana (5%), sangre, o terlipresina (15 µg/kg). En general si se emplea un cristaloiide se infunden 30-40 ml/kg, si se emplea un coloide 15 ml/kg, o pequeñas cantidades de coloide hipertónico (4 ml/kg) seguidas de transfusiones o cristaloiide.

- Ritmo de infusión del líquido: tiene mucha importancia en este tipo de shock, ya que influye en la posibilidad de resangrado y en la mortalidad. Un ritmo lento no será suficiente para recuperar al paciente y uno demasiado rápido puede empeorar el sangrado. Se puede iniciar a 2 ml/kg/min los primeros 10 min y aumentar a 8 ml/kg/min los 10 min siguientes si no alcanza una TAM > 40 mmHg.
- Periodos de observación: para poder valorar el efecto de la hemorragia y el del tratamiento hay que establecer periodos de observación sin realizar intervenciones terapéuticas (tras el inicio de la hemorragia, tras el tratamiento inicial y tras el tratamiento secundario). Estos periodos de observación variarán según el protocolo de estudio entre 30 y 120 minutos

### **Bibliografía**

- Rupérez M, López-Herce J, García C, Sánchez C, García E, Vigil D. Comparison Between Cardiac Output Measured by the Pulmonary Arterial Thermodilution Technique and that Measured by the Femoral Arterial Thermodilution Technique in a Pediatric Animal Model. *Pediatr Cardiol.* 2004;25:119-23.
- López-Herce J, Rupérez M, Sánchez C, García C, García E. Haemodynamic response to acute hypovolaemia, rapid volume expansion and adrenaline administration in an infant animal model. *Resuscitation* 2006;68:259-265.

- Urbano J, López-Herce J, Solana MJ, del Castillo J, Botrán M, Bellón JM. Comparison of normal saline, hypertonic saline and hypertonic saline colloid resuscitation fluids in an infant animal model of hypovolemic shock. *Resuscitation* 2012; 83:1159-65.
- Urbano J, González R, López J, Solana MJ, Bellón JM, Botrán M, García A, Fernández SN, López-Herce J. Comparison of Normal Saline, Hypertonic Saline Albumin and Terlipressin plus Hypertonic Saline Albumin in an Infant Animal Model of Hypovolemic Shock. *PLoS One*. 2015;10:e0121678.
- Voelckel WG, Raedler C, Wenzel V, Lindner KH, Krismer AC, Schmittinger CA, Herff H, Rheinberger K, Königsrainer A. Arginine vasopressin, but not epinephrine, improves survival in uncontrolled hemorrhagic shock after liver trauma in pigs. *Crit Care Med* 2003;31:1160-5.
- Bruttig SP, O'Benar JD, Wade CE, Dubick MA. Benefit of slow infusion of hypertonic saline/dextran in swine with uncontrolled aortotomy hemorrhage. *Shock* 2005;24:92-6.
- Brusca V, Poli de Figueiredo LF, Rasslan S, Varicoda EY, Rocha e Silva M: Fluid resuscitation improves hemodynamics without increased bleeding in a model of uncontrolled hemorrhage induced by an iliac artery tear in dogs. *J Trauma* 2002; 52:1147-52.
- Duggan MJ, Rago A, Marini J, Beagle J, Peev M, Velmahos G, Sharma U, King DR. Development of a lethal, closed-abdomen, arterial hemorrhage model in noncoagulopathic swine. *J Surg Res*. 2014;187:536-41.
- Berlman GJ, Groehler KE, Lazaron V, et al. Near-infrared spectroscopy measurement of regional tissue oxyhemoglobin saturation during hemorrhagic shock. *Shock* 1999;12:196-200

- Johansson PI, Stensballe J, Rasmussen LS, Ostrowski SR. A high admission syndecan-1 level, a marker of endothelial glycocalyx degradation, is associated with inflammation, protein C depletion, fibrinolysis, and increased mortality in trauma patients. *Ann Surg.* 2011;254:194-200.
- Sillesen M, Rasmussen LS, Jin G, Jepsen CH, Imam A, Hwabejire JO, Halaweish I, DeMoya M, Velmahos G, Johansson PI, Alam HB. Assessment of coagulopathy, endothelial injury, and inflammation after traumatic brain injury and hemorrhage in a porcine model. *J Trauma Acute Care Surg* 2014;76:12-9.

## **15. MODELO EXPERIMENTAL DE SHOCK HIPOVOLÉMICO EN RATAS**

Yolanda Ballesteros

Maria José Solana

Jesús López-Herce Cid

Servicio de Cuidados Intensivos Pediátricos

Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid

Red de Salud Materno-Infantil y del Desarrollo

Junio 2010

Revisado 2015

## **Animales de experimentación**

Se utilizan ratas machos Wistar de 300 gramos (2 meses).

Los animales se crían y estabulan en el animalario del pabellón de medicina y cirugía experimental antes del experimento.

## **Procedimientos**

Los procedimientos han sido aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA) del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Toda la manipulación de los animales se realiza según las normas sobre Protección de los animales utilizados para experimentación aplicada en la UMCE y se realizará por personal cualificado con Categoría B o C o bajo supervisión directa del responsable del proyecto.

Una vez finalizados los experimentos, los animales son sacrificados mediante una dosis supraanestésica de anestésicos (propofol o pentotal).

## **Material**

- Mesa de trabajo
- Microcentrífuga
- Cuna de cristal con tapa para inducción anestésica con sevoflurano
- Peso de precisión.
- Monitor adaptado a roedores.
- Cables de ECG subcutáneos que se colocan dentro de agujas
- Manta térmica con servocontrol.
- Sonda rectal de monitorización de temperatura..
- Sistemas de presión con llave de 3 pasos.
- Vaporizador de sevoflurano
- Crema depilatoria

- Empapadores
- Gasas y bastoncillos
- Espadradrapo
- Chinchetas
- Suero heparinizado con heparina sódica 1U por ml de SSF.
- Trepanador o similar
- Pinzas de Iris
- Pinzas de microcirugía.
- Tijeras de microcirugía
- Tijeras para hilos
- Hoja de bisturí
- Porta agujas pequeños
- Mosquitos pequeños
- Angiocatéteres de doble luz nº 24 (2)
- Suturas de 3/0 o menos
- Seda de 3 ceros
- Ligaduras
- Jeringas de 1 y 10 ml y jeringas para gasometría
- Palomilla de extracción de sangre de 21G
- Pipeta de 1 ml
- Lidocaína 2%
- Heparina
- Formol al 10% para fijación de muestras.

### **Anestesia y cirugía**

- Los animales permanecen las 12 horas previas al experimento a dieta absoluta y analgesiadas con antiinflamatorios no esteroideos (AINES).
- se aplica una gasa con unas gotas de sevoflurano en cubo de cristal tapado durante 1-2 minutos, hasta que la rata quede somnolienta.
- Posteriormente se realiza analgesia con AINES hasta su sacrificio

### **Procedimientos**

- Se prepara el material en la mesa de quirófano (ver hoja de material).
- Se pesan las gasas y bastoncillos que se van a emplear durante la canalización para descontarlo del volumen a extraer. Nosotros empleamos 5 gasas y 5 bastoncillos que pesan 5 gramos.
- Premedicación: se premedica a la rata en cubo de cristal tapado durante 1-2 minutos con gasa con unas gotas de sevoflurano hasta conseguir somnolencia.
- Se pesa con un peso de precisión.
- Anestesia y analgesia: se pasa al animal a la mesa de cirugía y se conecta a vaporizador con una mezcla de sevoflurano al 1-2% (según precise) y O<sub>2</sub>. Durante la canalización venosa, el periodo de shock, la expansión y la estabilización, se mantiene el animal con respiración espontánea anestesiado con sevoflurano 1,5%-2%.
- Se coloca al animal en decúbito supino con las patas delanteras y traseras extendidas inmovilizándolo en la mesa de cirugía mediante papel de esparadrapo que se sujeta con chinchetas.
- Se procede a la depilación de la zona inguinal.
- Se monitoriza el ECG en modo roedor. Los cables del ECG subcutáneos se colocarán dentro de agujas para alargar su duración.

- Se monitoriza la temperatura rectal mediante una sonda rectal conectada a una manta térmica con servocontrol.
- Se prepara microscopio para llevar a cabo la disección vascular.
- Se canaliza la vena femoral mediante disección y se coloca un angiocatéter de 24G para la medición de la presión venosa central continua y para la expansión con fluidos.
- Se aísla la arteria femoral mediante disección y se administran unas gotas de lidocaína tópica al 2% para que se dilate y facilite la canalización. Se introduce un angiocatéter de 24G para la medición continua de la presión arterial y obtención de muestras de sangre para analíticas, gasometría, y SB 100 y enolasa neuronal.
- Se colocan los alargadores en las vías (con un volumen de purgado de 0,3 ml).

#### **Monitorización y registro de datos basal**

- Se registran los datos en situación basal (frecuencia cardiaca, tensión arterial, presión venosa central, temperatura rectal) y se extrae gasometría arterial (0,2 ml para cada muestra).
- Los datos se obtienen tras la fase quirúrgica (basal), tras la realización de la hipovolemia y 30 minutos después de la expansión.

#### **Grupos terapéuticos**

- Los animales se distribuyen de forma aleatoria en grupos terapéuticos según el tipo de líquidos a estudiar.

#### **Inducción de la hipovolemia**

- Se realiza la hipovolemia mediante la extracción de 15 ml/kg de sangre en 60 minutos, aspirando con una jeringa de 1 ml por el catéter arterial.

- Se reserva el primer ml de la extracción para las muestras de SB-100 y enolasa neuronal y gasometría.
- Extracción de SB 100 y enolasa neuronal: se extrae 1 ml de sangre por tubo de extracción, se deja coagular la muestra durante aproximadamente 1 hora, y se centrifuga a 8 rpm, 10 min. Se extrae el suero y se almacena a -80°C.
- Se repiten las mediciones y analíticas al finalizar la extracción (hipovolemia) con el último ml de la extracción.
- Se realiza la primera resonancia magnética nuclear. RMN. El animal se inmoviliza en una cama adaptada para el equipo de RMN mediante sujeción estereotáxica del cráneo y hocico, manteniéndola anestesiada con un flujo del 2% de sevoflurano con oxígeno. Se administra contraste (Gd-DTPA 0,1 mmol/kg) por la vena de la cola para obtener imagen de perfusión. Además se obtienen imágenes anatómicas, de difusión y espectroscopia.

#### **Fase de expansión**

- Se decide el tipo de líquido que se va a emplear en la resucitación siguiendo una tabla de aleatorización: suero salino fisiológico o suero salino hipertónico (3%). Si se emplea el primero se infunden 20 ml/kg, si se emplea el suero hipertónico al 3% 10 ml/kg. El líquido se infunde en 1 hora por la vena femoral.
- Se repiten las mediciones, los gases y la RM (optativa) a los 30 minutos de finalizar la infusión.

#### **Fase de observación**

- Se retiran los angiocatéteres y se mantiene analgesiada con AINES al animal durante 24 horas.
- Se realiza una RMN a las 24 horas del procedimiento.

## **Finalización del experimento**

- Tras la realización de la última RMN, se procede al sacrificio del animal con una sobredosis de anestésicos (propofol) intraperitoneal.
- Inmediatamente se procede a exponer el corazón para extraer 1 ml de sangre del ventrículo izquierdo que servirá para determinar la SB100 y enolasa neuronal.
- Inmediatamente se perfunde una solución de lavado utilizando el torrente vascular. Para ello se introduce la palomilla del 21 G a través del ventrículo izquierdo y se infunden 10 o 20 ml de suero salino heparinizado (1 U de heparina por ml de SSF). Una vez que se ha lavado bien el cerebro se fija fijarlo entero infundiendo 10 ml de formaldehído al 10% a través de la palomilla. Posteriormente se extrae y se almacena en formol. Hay que tener en cuenta que la fijación con formol tiene que ser lo más rápida posible para evitar una mala preservación de las características estructurales y bioquímicas, por lo que el sacrificio del animal y la perfusión debe hacerse en el menor espacio de tiempo posible. Posteriormente se almacenan los cerebros extraídos en nevera.

## **Bibliografía**

- Meybohm P, Cavus E, Dörger V, Weber B, Stadlbauer KH, Wenzel V, Scholz J, Steffen M, Bein B. Release of protein S100B in haemorrhagic shock: effects of small volume resuscitation combined with arginine vasopressin. *Resuscitation*. 2008;76:449-56.
- Sánchez-González J, Tsao J, Dydak U, Desco M, Boesiger P, Paul Pruessmann K. Minimum-norm reconstruction for sensitivity-encoded

magnetic resonance spectroscopic imaging. *Magn Reson Med.* 2006;55:287-95.

- Toyoshima M, Maegaki Y, Sugihara S, Ohno K. Serial diffusion-weighted MRI in hemorrhagic shock and encephalopathy syndrome. *Pediatr Neurol.* 2007;36:66-9.
- Vermeulen RJ, Fetter WP, Hendrikx L, Van Schie PE, van der Knaap MS, Barkhof F. Diffusion-weighted MRI in severe neonatal hypoxic ischaemia: the white cerebrum. *Neuropediatrics.* 2003;34:72.
- Chiara O, Pelosi P, Brazi L, et al. Resuscitation from hemorrhagic shock: experimental model comparing normal saline, dextran, and hypertonic saline solutions. *Crit Care Med.* 2003;31:1915-22.
- Watters JM, Tieu BH, Differding JA. A single bolus of 3% hypertonic saline with 6% dextran provides optimal initial resuscitation after uncontrolled hemorrhagic shock. *J Trauma* 2006;61:75-81.
- Schroth M, Planck C, Meisner U, et al. Hypertonic-hyperoncotic solutions improve cardiac function in children after open-heart surgery. *Pediatrics* 2006;118:76-84.
- López-Herce J, Rupérez M, Sánchez C, García C, García E. Haemodynamic response to acute hypovolaemia, rapid volume expansion and adrenaline administration in an infant animal model. *Resuscitation* 2006;68:259-65.

# **MODELO EXPERIMENTAL DE INSUFICIENCIA RENAL AGUDA Y TÉCNICAS DE DEPURACIÓN EXTRARRENAL AGUDA EN CERDOS**

María José Santiago Lozano

Sarah Nicole Fernández Lafever

Jesús López-Herce Cid

Servicio de Cuidados Intensivos Pediátricos

Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid

Red de Salud Maternoinfantil y del Desarrollo

Abril 2015

## **Animales de experimentación**

Se utilizan lechones de cerdos enanos de estirpe Maryland de 2 a 3 meses de edad, de entre 8 a 11 kg isogénicos para 3 loci del complejo mayor de histocompatibilidad.

Los animales se transportan desde la granja autorizada por la Comunidad de Madrid en la misma semana del experimento, permaneciendo estabulados en el animalario del pabellón de medicina y cirugía experimental 24 horas antes del experimento.

## **Procedimientos**

Todos los procedimientos con animales se realizan siguiendo la normativa legal. El procedimiento experimental ha sido diseñado por personal homologado y es supervisado por el responsable del Área de Experimentación Animal, aprobado por la Comisión de Investigación del Centro.

## **Inducción del fallo renal**

Se induce un fallo renal agudo no oligúrico mediante la administración de cisplatino 3 mg/kg intravenoso 48 horas antes del experimento.

## **Anestesia y cirugía**

- Los animales permanecen 12 horas a dieta absoluta previamente al experimento.
- Se premedican con ketamina (15 mg/kg) y atropina (0,03 mg/kg) i.m.
- Se introduce un catéter (24G) en la vena periférica de la oreja y se monitoriza el ECG y la pulsioximetría transcutánea.
- Se induce la anestesia con fentanilo (5 µg/kg), propofol (3 mg/kg) y atracurio (2,5 mg/kg). Tras preoxigenar ventilando con bolsa autoinflable y mascarilla, se realiza intubación orotraqueal con un tubo balonado (4,5 mm ID) y se

conectan a un respirador convencional, con unos parámetros iniciales de volumen corriente (VC): 10 ml/kg, frecuencia respiratoria (FR): 20 rpm, presión espiratoria final (PEEP): 4 cmH<sub>2</sub>O, relación inspiración: espiración (I:E): 1:2. F<sub>i</sub>O<sub>2</sub> 0,4. Se ajusta el VC y FC para mantener una CO<sub>2</sub> espirada de 35 mmHg,

- Se conecta una pieza “en T” entre la tubuladura y el filtro humidificador para medir consumo calórico mediante calorimetría indirecta con el monitor Datex-Ohmeda®.
- Control de la temperatura: se controla la temperatura mediante la colocación de una manta eléctrica para mantener normotermia (38-39°C)
- Sedación. una vez iniciada la ventilación mecánica se mantiene una infusión continua de propofol (10 mg/kg/h), y tras canalizar la primera vía central otra de fentanilo (10 µg/kg/h) más atracurio (2,5 mg/kg/h), en suero glucosado al 5%.
- Fluidoterapia para mantenimiento de necesidades basales con suero glucosado al 5% a 3 ml/kg/h.
- Se colocan dos sensores pediátricos de oximetría transcutánea INVOS 3100 (Somanetics®), uno en el cráneo y otro en la zona renal-lumbar derecha.
- Flujo tisular: se sutura el sensor de flujo tisular en la superficie del abdomen.
- Canalización arterial: se canaliza la arteria femoral mediante disección o mediante punción directa con control ecográfico, para introducir un catéter (3 ó 5 F; PV2014L08, PiCCO Pulsion®), para la medición continua de la presión arterial, gasto cardíaco y temperatura de la sangre. A través de este catéter, también se obtienen muestras de sangre para equilibrio ácido-base.

- Canalización venosa central y gasto cardiaco: se coloca un catéter de 5-7 F (mediante disección o punción directa guiada por ecografía) en la vena femoral para medición de gasto cardiaco, infusión de medicación y extracción de analíticas. Posteriormente se canaliza la vena yugular externa o la otra vena femoral para la colocación de un catéter de hemofiltración de 8F.
- Talla vesical: se realiza una incisión cutánea a nivel de las dos últimas mamilas en línea media. Se disecciona en línea alba. Se expone la vejiga. Se realiza sutura continua circular con un diámetro de dos centímetros, aproximadamente. Se realiza punción con bisturí y se introduce inmediatamente la sonda Foley para medición de la diuresis y extracción de muestras de orina. Se extrae la primera analítica de orina (basal) y se conecta al sistema de recogida de orina.
- Disección arteria renal y colocación de medición de flujo por doppler: se coloca al animal decúbito lateral derecho; se localiza la posición del riñón con ecografía, habitualmente bajo la última costilla, se realiza una incisión cutánea en "L", disecando por delante de los músculos paravertebrales; se localiza el pedículo vascular (generalmente por detrás del riñón); se comprueba que sólo tiene una arteria renal y se disecciona; se pasa el sensor a través de la piel con ayuda de un catéter de punción pleural y se coloca el sensor alrededor de la arteria renal; finalmente se coloca el animal de nuevo en decúbito supino.

### **Grupos terapéuticos**

Los animales se distribuyen de forma aleatoria (no ciega) en dos grupos:

- a) Animales sin insuficiencia renal.

b) Animales con insuficiencia renal inducida por toxicidad por cisplatino.

### **Técnica de depuración extrarrenal venovenosa continua (TDEC)**

- Se realiza con el monitor Prismaflex, con un filtro HF20 en modalidad hemodiafiltración con los siguientes parámetros: flujo sanguíneo de 5 ml/kg/min, sustitución: 20 ml/kg/hora, diálisis: 20 ml/kg/hora, extracción necesaria para lograr un balance neutro (entradas = diuresis – extracción).
- Previamente se purga el sistema con 1 litro de SSF heparinizado. Como líquido de sustitución y diálisis se utiliza Hemosol B0 (añadiendo cloruro potásico en función de la kaliemia basal del animal).
- La anticoagulación se realiza con heparina (bolo inicial de 150 UI/kg seguido de una perfusión a 40 UI/kg/h). La perfusión de heparina se ajusta en función del resultado del control de ACT realizado a las 3 horas del inicio de la técnica (Objetivo ACT > 200 segundos).
- Método de conexión: la conexión se realiza con un flujo sanguíneo inicial de 20 ml/min y se va aumentando de 10 en 10 ml/min cada minuto hasta llegar al flujo sanguíneo objetivo de 5 ml/kg/min. Una vez alcanzado el flujo de sangre objetivo se programan los demás parámetros: flujo de diálisis, de sustitución y de extracción. Durante la conexión se anota la tensión arterial mínima y en qué minuto ha sucedido. Se debe poner el calentador del sistema de depuración desde el primer momento a 41°C para evitar la hipotermia.

### **Registro de datos**

- Se registran los siguientes datos:
  - Analíticas de sangre y orina: equilibrio ácido-base y gasometría (arterial y venosa), hemograma, bioquímica (función hepática, renal, amilasa y

lipasa, osmolaridad, ionograma) y coagulación (10 ml en total), examen básico de orina, bioquímica en orina, sedimento. Así mismo se pueden guardar muestras de sangre y orina para congelar (para realización posterior de otros marcadores de función renal).

- Contantes respiratorias y hemodinámicas: frecuencia cardiaca, tensión arterial (sistólica, diastólica y media), temperatura sanguínea, índices de oxigenación tisular cerebral y esplácnico, calorimetría indirecta (consumo de O<sub>2</sub>, producción de CO<sub>2</sub>, coeficiente respiratorio y consumo calórico), frecuencia respiratoria, volumen corriente, y CO<sub>2</sub> espirado. El gasto cardiaco se mide mediante el sistema PiCCO con 5 ml de suero frío para la termodilución (al menos en dos ocasiones consecutivas) y se registran los valores hemodinámicos obtenidos (gasto e índice cardiaco, índice de resistencias vasculares sistémicas, índice de sangre intratorácica, índice de volumen sistólico, variabilidad del volumen sistólico, volumen global telediastólico, índice de agua extravascular pulmonar, índice de función cardiaca y contractilidad) y microcirculación sublingual.
- Parámetros renales: flujo arterial renal medido por el sensor doppler colocado sobre la arteria renal en el riñón izquierdo, ecografía doppler renal en el riñón derecho (en el que no se ha colocado el sensor de flujo) y las entradas totales de líquidos y la diuresis.
- Parámetros de hemodiafiltración: flujos (sangre, diálisis, sustitución, extracción) y presiones (entrada, retorno, de filtro, caída de presión, presión transmembrana, efluente).
- Los datos se obtienen tras la fase quirúrgica (basal) y tras la conexión a la hemodiafiltración: a los 5, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300 y 360 minutos. La

realización de gasometría, analítica, gasto cardiaco, microcirculación y ecografía doppler se realizan siguiendo el cronograma que se detalla a continuación:

	<b>BASAL</b>	<b>5 min</b>	<b>15 min</b>	<b>30 min</b>	<b>60 min</b>
Analítica	X			X	
Gasometría	X		X	X	X
Gasto cardiaco	X	X	X	X	X
Microcirculación	X	X			
Eco-doppler	X			X	X

	<b>120 min</b>	<b>180 min</b>	<b>240 min</b>	<b>300 min</b>	<b>360 min</b>
Analítica	X				X
Gasometría	X	X	X	X	X
Gasto cardiaco	X	X	X	X	X
Microcirculación	X				X
Eco-doppler	X	X	X	X	X

### **Finalización del experimento**

- El experimento finaliza tras la recogida de todos los datos tras 6 horas de técnica de depuración extrarrenal.
- Se procede a la extracción quirúrgica del riñón izquierdo: se localiza de nuevo el pedículo renal, se liga el pedículo vascular proximal y distal y se extrae el riñón. Inmediatamente después se toman dos muestras del riñón que incluyan corteza y médula renal.

- Sacrificio del animal: una vez finalizado el experimento los animales serán sacrificados mediante una dosis supraanestésica de propofol y fentanilo y un bolo rápido de cloruro potásico intravenoso.

#### **Procesamiento de las muestras:**

- Envío de las analíticas de sangre y orina al laboratorio.
- Centrifugación de las muestras para bioquímica especial: Se centrifugarán a 4°C a 2000 rpm durante 15 minutos. Se extraerán 1000µL de suero/orina para guardarlos en un tubo de Eppendorf rotulado en un congelador a -80°C.
- Muestras de tejido renal:
  - Una muestra para anatomía patológica para evaluar daño glomerular y daño túbulo-intersticial (mantener en paraformaldehído al 4% durante 24 horas).
  - Otra muestra fragmentada para estudios especiales. Esta muestra se introducirá en un criovial y se ultracongelará con nitrógeno líquido para almacenaje en congelador de -80°C junto con las muestras de suero y orina.

#### **Bibliografía**

- Oh GS, Kim HJ, Shen A, Lee SB, Khadka D, Pandit A, So HS. Cisplatin-induced kidney dysfunction and perspectives on improving treatment strategies. *Electrolyte Blood Press.* 2014;12:55-65.
- Miller RP, Tagadavadi RK, Ramesh G, Reeves WB. Mechanisms of cisplatin nephrotoxicity. *Toxins.* 2010; 2:2490-518.
- Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K. Cisplatin nephrotoxicity: a review. *American Journal of the medical sciences.* 2007;334:115-24.

- Du Y, Zappitelli M, Mian A, Bennet M, Ma Q, Devarajan P, Mehta R, Goldstein SL. Urinary biomarkers to detect acute kidney injury in the pediatric emergency center. *Pediatr Nephrol*. 2011;26:267-74.
- Daugaard G. Cisplatin nephrotoxicity: experimental and clinical studies. *Dan Med Bull*. 1990;37:1-12.
- Camano S, Lazaro A, Moreno-Gordaliza E, Torres AM, de Lucas C, Humanes B, Lazaro JA, Milagros Gomez-Gomez M, Bosca L, Tejedor A. Cilastatin attenuates cisplatin-induced proximal tubular cell damage. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010;334:419-29.
- Moghadasali R, Azarnia M, Hajinasrollah M, Arghani H, Nassiri SM, Molazem M, Vosough A, Mohitmafi S, Najarasl M, Ajdari Z, Yazdi RS, Bagheri M, Ghanaati H, Rafiei B, Gheisari Y, Baharvand H, Aghdami N. Intra-renal arterial injection of autologous bone marrow mesenchymal stromal cells ameliorates cisplatin-induced acute kidney injury in a rhesus Macaque mulatta monkey model. *Cytotherapy*. 2014;16:734-49.

## **17. MODELO EXPERIMENTAL DE SÍNDROME DE ALCOHOL FETAL EN RATONAS GESTANTES.**

Laura Almeida Toledano.

Miriam Illa Armengol.

María Dolores Gómez Roig.

Eduard Gratacos Solsona.

Servicio de Obstetricia y Ginecología

BCNatal. Hospital Clínico y Hospital San Juan de Dios de Barcelona.

Red de Salud Maternoinfantil y del Desarrollo

Septiembre 2014

Revisado Febrero 2015

## **Animales de experimentación**

Se utiliza la cepa de ratones C57BL/6, de 8-10 semanas de vida, que ha demostrado una gran avidez por el alcohol.

Los animales provienen de Charles River (France) y se mantienen una semana antes de iniciar el procedimiento en el estabulario para su adaptación al entorno y a los cuidadores.

Las condiciones de estabulación son las siguientes:

- Temperatura 21°C
- Humedad 550%
- Ciclo luz-oscuridad invertido
- Administración de agua y comida *ad libitum*

## **Grupos experimentales**

Para establecer los cruces, se alojarán 1 macho con 2 hembras durante una noche, considerándose día 0 de gestación la mañana siguiente siempre que observe tapón vaginal espermático. En este momento las ratonas preñadas serán separadas y alojadas individualmente.

Las ratonas gestantes se distribuyen de forma aleatoria en los diferentes grupos experimentales.

## **Procedimientos**

El decreto 214/1997, de 30 de Julio, que desarrolla la ley 5/1995, de 21 de Junio, de la Generalitat de Catalunya, de protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, establece que los centros usuarios de animales están obligados a crear comités éticos de experimentación animal, los cuales han de velar por el cuidado y el bienestar de los animales.

Según esto, y cuando no se encuentran métodos alternativos para la realización del experimento, el procedimiento se presenta al Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA).

### **Administraciones de alcohol**

Las hembras preñadas incluidas al grupo de ingesta de alcohol se randomizan en dos modelos experimentales según la pauta de administración de alcohol.

Así, uno de los grupos recibe una solución de alcohol al 20% mediante una pipeta graduada y adaptada para evitar pérdidas de líquido, durante 2 horas al día, 3 días/semana y durante 4 horas al día durante 1 día/semana, comenzando dos horas después del inicio de la fase oscura; durante los 3 días restantes no reciben alcohol. Este grupo corresponde al consumo de alcohol en forma de atracón o *binge drinking*.

El segundo grupo recibe una solución de alcohol al 5% dos veces al día durante 2 horas en cada periodo, comenzando dos horas después de que se inicie la fase de oscuridad y la segunda exposición se inicia 9 horas después de que haya comenzado la fase de oscuridad. Este segundo grupo corresponde al consumo de alcohol moderado o “mediterráneo”.

Ambos grupos experimentales tienen acceso a un biberón de agua “ad libitum”.

Se calcula el etanol y el agua consumidas corregido por diferencias individuales en función del peso de la ratona. La preferencia del etanol se expresa como volumen de solución de alcohol consumido por volumen total diario.

Para cuantificar los niveles de alcohol en sangre, se sacrifican 4-5 ratonas gestantes de cada grupo: *binge drinking* y consumo mediterráneo.

### **Inducción de retraso de crecimiento intrauterino mediante restricción calórica**

Inicialmente se evalúa el consumo medio diario en un grupo de ratonas gestantes los días de gestación GD4-17 con acceso a comida y agua *ad libitum*. Una vez establecido el consumo medio diario, se realiza una restricción calórica del 50% en el grupo de ratonas gestantes al que queremos inducir un retraso de crecimiento fetal (CIR) durante los días GD4-17.

### **Finalización de la gestación**

El parto de las ratonas se dejará evolucionar de forma espontánea vía vaginal.

Las madres se sacrificarán, mediante sobredosis anestésica con isoflurano, en el momento en que se produzca el destete (19-21 días tras el parto).

### **Seguimiento de las crías**

Cada camada se dividirá en 2 subgrupos:

1. Aquellas crías que se sacrifican a día + 1 para estudios antropométricos y recogida de muestras
2. Aquellas crías a las que se realiza seguimiento hasta la fase de adultos (60-70 días) para el estudio del neurodesarrollo y funcionalismo cardíaco

### **Determinaciones experimentales**

#### **Estudio antropométrico**

Tras los partos vaginales, se calculará el tamaño de los fetos multiplicando el diámetro cráneo-caudal por el diámetro dorso-ventral de cada feto. Se pesará cada feto y las placentas por separado. Posteriormente se calculará el porcentaje de fetos con CIR, calculando el número total de fetos del grupo control y el número de fetos de los grupos sometidos a consumo de alcohol que cumplan criterios de CIR (aquellos con un peso 2 DE por debajo del peso de la media).

#### **Estudio histológico de la placenta**

Las muestras de tejido placentario recogidas se fijarán en formol al 10% y los cortes se prepararán en medio de parafina siguiendo la técnica habitual. Se realizarán tinciones con hematoxilina-eosina de las secciones para su evaluación histológica

### **Estudio cardiovascular**

- Evaluación histológica del corazón: las muestras de tejido cardíaco recogidas se fijarán en formol al 10% y los cortes se prepararán en medio de parafina siguiendo la técnica habitual. Se realizarán tinciones con hematoxilina-eosina de las secciones para su evaluación histológica.
- Ecocardiografía: Se llevará a cabo la evaluación ecocardiográfica de la descendencia mediante el ecógrafo Siemens Sonoline Antares (Siemens Medical Systems, Malvern, PA, USA) con una sonda lineal 14e10 MHz (será un General Electrics) bajo anestesia con isoflurano. El índice de rendimiento miocárdico (MPI) se evaluará en el corazón izquierdo. Las adquisiciones se realizarán en la pared lateral de la aorta ascendente en un corte apical de 4 cámaras. Se estimarán el tiempo de contracción isovolumétrica (ICT) desde el cierre de la válvula mitral hasta la apertura de la válvula aórtica, el tiempo de eyección (ET) desde la apertura hasta el cierre de la válvula aórtica y el tiempo de relajación isovolumétrica (IRT) desde el cierre de la válvula aórtica hasta la apertura de la válvula mitral. El MPI final se calculará como:  $(ICT \div IRT)/ET$ .

### **Estudio del sistema nervioso**

Obtención de muestras de tejido cerebral para la realización de tinciones de Nissl y técnica de inmunohistoquímica para la determinación de NeuN, además determinaciones de GFAP, Iba 1, BrdU, TUNEL, TNF-  $\alpha$ , IL-6, IL1 y BDNF.

### **Estudio morfométrico facial**

Para el estudio de la morfometría facial se elegirán de forma aleatoria 4 animales por camada. Tras fijarlos en formol al 10% durante 48h, se examinarán de forma ciega al observador. Se evaluarán como variables cualitativas: existencia y tipo de fisuras faciales, presencia de exoftalmos o enoftalmos, ausencia de bigotes, implantación normal o baja de los pabellones auriculares, malformaciones de pabellón auricular (anotia, microtia o pabellón dismórfico), presencia y posición de apéndices faciales y deformidades nasales. Como variables cuantitativas se usarán las mediciones de visión frontal y lateral siguientes: longitud del proceso maxilar, longitud anteroposterior de la mandíbula, distancia entre poro nasal y pabellón y la distancia entre el punto cefálico más alto y el pabellón. Para evitar los sesgos que pudiera haber entre grupos y entre animales de distinto peso, la magnitud de cada variable cuantitativa se dividirá entre la magnitud media paralela de su grupo correspondiente. De esta manera en lugar de comparar longitudes crudas de cada medida, se compararán longitudes corregidas. Para todas las mediciones se usará un Software de medida científico (Image ProPlus 5.0, Media Cybernetics, USA).

### **Estudio de hipoplasia pulmonar**

- Obtención de bloques traqueopulmonares: Se extraerán los bloques traqueopulmonares en los animales a término (GD21) bajo microscopio quirúrgico. Los bloques se pesarán, fotografiarán y observarán para determinar su estructura lobar.
- Determinación del contenido de DNA y proteínas totales de los pulmones: para lo que serán congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . En la mitad de ellos se extraerá el

DNA utilizando el kit QIAamp DNA Micro kit (Qiagen) y el contenido total de DNA será medido a 260 nm con la ayuda del espectrofotómetro (Nano Drop). La otra mitad se homogeneizarán y el contenido proteico se medirá utilizando el kit BCATM protein assay (Pierce).

- Estudio histológico e inmunohistoquímico del parénquima y de los vasos pulmonares: Tras canular la tráquea se inyectará formol tamponado al 4% a una presión de 10 cm/H<sub>2</sub>O para distender los alveolos mientras se fijan los bloques en el mismo líquido durante 24 horas. Se canulará la arteria pulmonar y se ligará la aorta, perfundiendo el lecho pulmonar a 40 cm H<sub>2</sub>O. Tras inclusión en parafina, se realizarán cortes a 5 u y se teñirán con HE, PAS, Masson y con anticuerpos anti-TTF-1, HNF3 $\beta$  y SPB (Dako, Dinamarca). Con ayuda de un software de análisis de imagen (Image ProPlus 5.0) se determinará bajo microscopio el recuento alveolar radial (RAR) así como los diámetros de los vasos arteriales y venosos y el espesor de sus capas adventicia y muscular.

### **Neurodesarrollo**

Una vez hayan nacido las crías de las ratonas gestantes que no han recibido EGCG (grupos control, B-OH, M-OH y CIR), 2/3 de esta descendencia (50% tras administración diaria de EGCG y 50% sin administración diaria de EGCG) será evaluada a día +60-70 en diversos modelos comportamentales que nos permitirán identificar cambios en:

- Patrones generales: curvas de peso y consumo de comida.
- Comportamiento en general: actividad locomotora (actímetro) y coordinación motora (“rotarod”)

- Respuestas de tipo emocional: ansiedad (*open field* y laberinto en cruz), respuesta de “tipo depresivo” o de desespero (test de suspensión de la cola)
- Respuestas de tipo cognitivas: evitación pasiva, el test de reconocimiento de objetos, piscina de Morris, caja de Skinner

### **Marcadores en sangre**

Obtención de muestras de sangre mediante punción intracardíaca en el momento de la eutanasia para la determinación de la concentración de alcohol en sangre, actividad ADH y ALDH, neurotransmisores, IGF-I, IGF-II, IGFBP-3 y GH.

### **Supervisión de los animales**

Los animales se evalúan mediante el protocolo de supervisión de Morton y Griffiths en aquellas fases del proyecto que el animal pudiera experimentar sufrimiento, dolor o angustia para aplicar las medidas correctoras correspondientes según la puntuación obtenida: nada, analgesia o eutanasia:

1. Pérdida de peso (0-3)
  - Normal (0)
  - Menor 10 % (1)
  - 10-20% (2)
  - Mayor 20% (3)
2. Aspecto (0-3)
  - Normal (0)
  - Mal estado (1)
  - Mal estado y/o presencia de secreciones oculares o nasales (2)
  - Postura anormal (3)
3. Comportamiento espontáneo (0-3)

- Normal (0)
- Pequeños cambios (1)
- Inactividad (2)
- Automutilación, vocalizaciones anormales, animales muy inquietos o inmóviles (3)

#### 4. Comportamiento en respuesta a la manipulación (0-3)

- Normal (0)
- Cambios pequeños (1)
- Cambios moderados (2)
- Animales agresivos o comatosos (3)

Puntuación:

- 0 a 3 Normal
- 4 a 9 Administración de analgesia (buprenorfina subcutánea 0.05 mg/Kg cada 8 horas)
- 10 a 12 Eutanasia (isofluorano vía inhalatoria)

Se aplicará el protocolo de eutanasia aunque no haya finalizado el procedimiento en las siguientes situaciones:

- Eliminar el dolor y estrés que no pueda ser aliviado con analgésicos, sedantes u otros tratamientos
- Puntuación 10-12 según el protocolo de supervisión de Morton y Griffiths
- Independientemente de la puntuación, si el animal se encuentra en estado comatoso, sufre convulsiones o presenta una postura anormal que indica un sufrimiento intenso se procederá a la eutanasia

### **Eutanasia**

Los animales se sacrifican mediante sobredosis anestésica con isofluorano inhalado (isofluorano al 4% + O<sub>2</sub> al 21%) en el momento de finalizar el experimento o si está indicado según el protocolo de supervisión de Morton y Griffiths.

### **Bibliografía**

- Rhodes JS, Ford MM, Yu CH, Brown LL, Finn DA, Garland T Jr, Crabbe JC. Mouse inbred strain differences in ethanol drinking to intoxication. *Genes Brain Behav.* 2007;6:1-18
- Boehm SL 2nd, Moore EM, Walsh CD, Gross CD, Cavelli AM, Gigante E, Lisenbardt DN. Using drinking in the dark to model prenatal binge-like exposure to ethanol in C57BL/6 mice. *Dev Psychobiol.* 2008;50:566-78
- Gallego X, Ruiz-Medina J, Valverde O, Molas S, Robles N, Sabrià J, Crabbe JC, Dierssen M. Transgenic over expression of nicotinic receptor alpha 5, alpha 3, and beta 4 subunit genes reduces ethanol intake in mice. *Alcohol* 2012;46:205-15
- Attwood AS, Rogers PJ, Ataya AF, Adams S, Munafò MR. Effects of caffeine on alcohol-related changes in behavioural control and perceived intoxication in light caffeine consumers. *Psychopharmacology (Berl).* 2012;221:551-60
- Rogers EH, Hunter ES, Rosen MB, Rogers JM, Lau C, Hartig PC et al. Lack of evidence for intergenerational reproductive effects due to prenatal and postnatal undernutrition in the female CD-1 mouse. *Reprod Toxicol.* 2003;17:519-25
- Rhodes JS, Best K, Belknap JK, Finn DA, Crabbe JA. Evaluation of a simple model of ethanol drinking to intoxication in C57BL/6J mice. *Physiology & Behaviour* 2005;84:56-63

- Stephen L. Boehm II, Eileen M. Moore, Cherie D. Walsh, Carly D. Gross, Austin M. Cavelli, Eduardo Gigante, and David N. Linsenbardt. Using Drinking in the Dark to model prenatal binge-like exposure to ethanol in C57BL/6J mice. *Dev Psychobiol.* 2008;50: 566-78
- Verónica Balaszczuka, Christian Bendera, Germán Perenob, Carlos A. Beltramino. Binge alcohol-induced alterations in BDNF and GDNF expression in central extended amygdala and pyriform cortex on infant rats. *Int. J. Devl Neuroscience.* 2013;31:287-96
- Eileen M. Moore, Kristen M. Serio, Karen J. Goldfarb, Sandra Stepanovska, David N, Linsenbardt, and Stephen L. Boehm II. GABAergic modulation of binge-like ethanol intake in C57BL/6J Mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2007; 88:105-13
- R. Colin Carter, Joseph L. Jacobson, Robert J. Sokol, Malcolm J. Avison and Sandra W. Jacobson. Fetal Alcohol-Related Growth Restriction from Birth through Young Adulthood and Moderating Effects of Maternal Prepregnancy Weight. *Alcoholism: clinical and experimental research.* 2013;37:452-62
- Rogers EH, Hunter ES, Rosen MB, Rogers JM, Lau C, Hartig PC et al. Lack of evidence for intergenerational reproductive effects due to prenatal and postnatal undernutrition in the female CD-1 mouse. *Reprod Toxicol.* 2003;17:519-25
- Ling Long, Yi Li, Yi Dong Wang, Qing Yu He, Mei Li, Xiao Dong Cai, Kou et al. The Preventive Effect of Oral EGCG in a Fetal Alcohol Spectrum Disorder Mouse Model. *Alcohol Clin Exp Res,* 2010;34:1929-36
- Wang X: Effects of acute alcohol intoxication in the second trimester of pregnancy on the murine fetal lung. *Am J Obstet Gynecol* 2007;197:269.

- Cudd TA: Animal model systems for the study of alcohol teratology. *Exp Biol Med (Maywood)* 2005;230:389-93.
- Sulik KK: Fetal alcohol syndrome and DiGeorge anomaly: critical ethanol exposure periods for craniofacial malformations as illustrated in an animal model. *Am J Med Genet* 1986;Suppl 2:97-112.
- Lebel C: A longitudinal study of the long-term consequences of drinking during pregnancy. *J Neurosci* 2012;32:15243-51.
- Roitbak T, et al., Moderate fetal alcohol exposure impairs neurogenic capacity of murine neural stem cells isolated from the adult subventricular zone. *Exp Neurol*. 2011;229:522-5

## **18. MODELO DE CRECIMIENTO INTRAUTERINO RETARDADO POR LIGADURA DE VASOS UTEROPLACENTARIOS EN CONEJA GESTANTE.**

Miriam Illa Armengol

Maria Dolores Gomez Roig

Eduard Gratacos Solsona.

Centro de Investigación en Medicina Fetal y perinatal, IDIBAPS

BCNatal (Centro de Medicina Maternofetal y Neonatal Barcelona)

Hospital Clínico y Hospital San Juan de Dios, Universidad de Barcelona

Febrero 2015

## **Animales de experimentación**

Se utilizan conejas gestantes de > 32 semanas de vida, de unos 5 kg de peso. Por cada coneja gestante randomizada al grupo de restricción de crecimiento intrauterino (RCIU) se incluirá una coneja gestante nodriza para amamantar a las crías sujetos de estudio. Unas conejas se randomizarán a recrear la restricción de crecimiento (RCIU) mediante la ligadura quirúrgica de los vasos uteroplacentarios mientras que otras serán randomizadas a dieta normal. Los sujetos de estudio serán las crías.

## **Procedimientos**

Todos los procedimientos con animales se realizan siguiendo la normativa legal. El procedimiento experimental ha sido diseñado por personal homologado y es supervisado por el responsable del Área de Experimentación Animal, aprobado por la Comisión de Investigación del Centro.

## **Cirugía: Inducción del RCIU y obtención crías**

Las conejas gestantes llegarán al animalario y se mantendrán en jaulas separadas, con ciclos de oscuridad y luz durante 12 horas con libre acceso a agua y pienso sin antibiótico (Purina Laboratory Chow®). Después de un periodo de aclimatación mínimo de 72 horas se procederá a la realización del insulto hipóxico en el día +25 de gestación (25D) en el Subgrupo de conejas gestantes randomizadas a recrear el RCIU. En ese mismo momento se realizará la asignación aleatoria de cada una de las gestantes en los diferentes grupos de intervención (A, B, C). En las conejas randomizadas a recrear RCIU, se procederá a la administración de la medicación preanestésica con xilacina 5mg / kg (Rompun® 2%, Bayer)+ketamina 30 mg / kg i.m. (Ketolar® 50mg / ml, Pfizer) así como profilaxis antibiótica con penicilina G 300.000UI e.v.

(Penilevel® 1.000.000, Laboratorios ERM). Como profilaxis tocolítica se administrará progesterona 0.9mg / kg s.c. (Progesterol® 2mg / ml, Laboratorios Ovejero) antes del inicio de la intervención. El mantenimiento anestésico se llevará a cabo mediante la administración de una perfusión endovenosa de Ketamina y Xilacina (10 mg / kg + 3mg / kg). De forma puntual, y si el nivel anestésico del animal así lo indica, se administrará Propofol ev (1.5-2mg / kg) como anestesia de rescate. Como apoyo respiratorio se colocará una mascarilla con administración de oxígeno a 4-5 litros / minuto. Durante la intervención se monitorizará la saturación de oxígeno y frecuencia cardiaca mediante la colocación de pulsioxímetro en una de las extremidades inferiores así como la temperatura central con un sensor rectal y la presión arterial en una de las extremidades inferiores (Pluto Veterinary Medical Monitor, Bionics corp.). Después de la inducción anestésica, se procederá al rasurado del abdomen con posterior limpieza de la superficie cutánea con solución yodada. Seguidamente se practicará una laparotomía media con exteriorización de ambos cuernos uterinos que se mantendrán húmedos con Ringer Lactato durante toda la intervención con una duración de unos 20-30 minutos. Se procederá a contar el número total de sacos gestacionales de ambos cuernos y se procederá a la ligadura selectiva de un 40-50% de los vasos útero-placentarios de cada feto de uno de los cuernos uterinos escogido al azar con seda 3/0 mientras que los fetos del cuerno contralateral se considerará como grupo control. Finalizada la intervención se devolverá a la cavidad abdominal ambos cuernos uterinos y se cerrará peritoneo, músculo y fascia con puntos sueltos de Seda 2/0 y posteriormente cierre de la piel con puntos sueltos de Seda 2/0. Como medicación analgésica, antes de suturar la piel se infiltrará

Bupivacaína 0,5% 5ml y posteriormente se administrará Buprenorfina (Buprex) a razón de 0,05-0,05mg/kg. Posteriormente, se continuará con la misma medicación por vía oral, administrándola en el agua (0,45 ml por cada litro de agua, que equivale a administrar 0,03ml de Buprex/5kg/8h) durante 2 días más. Posteriormente, a los 30D de gestación se practicará una cesárea bajo la misma técnica anestésica antes descrita. En el posparto inmediato se tomará especial cuidado del mantenimiento de la temperatura de las crías así un control del estado de sedación de las crías estimulando a aquellas crías con signos evidentes de depresión por acumulación excesiva de la anestesia administrada a la madre durante la cesárea. Se recogerán los datos antropométricos de todos los conejos supervivientes. Una vez finalizada la extracción de todas las crías, se administrará eutanasia de las madres mediante la administración de pentobarbital 200mg / kg e.v.

### **Randomización a grupos terapéuticos**

Los animales se distribuirán de forma aleatoria en grupos terapéuticos según los fármacos o técnicas a estudiar:

- Grupo A: conejas gestantes randomizadas a recrear el modelo de RCIU sin terapia (RCIU puros).
- Grupo B: conejas gestantes con RCIU randomizadas terapia perinatal con Omega3.

La administración del omega 3 iniciará en el mismo día de la inducción de RCIU (22 días de gestación) y se mantendrá hasta el destete (30 días de vida). La administración se realizará por vía oral a razón de 200mg/kg/día.

- Grupo C: conejas gestantes con RCIU randomizadas a estimulación postnatal. En el subgrupo de crías randomizadas a estimulación postnatal,

se procederá a aumentar el enriquecimiento ambiental de los sujetos mediante un aumento del acercamiento del investigador al animal así como la utilización de juguetes o materiales que favorezcan el enriquecimiento ambiental. Se iniciará a partir de los 30 días de vida.

### **Seguimiento a largo plazo de las crías**

A). Del total de crías derivadas de los diferentes protocolos de intervención se realizará una evaluación funcional de los parámetros cardiovasculares:

- Presión sanguínea mediante un método no invasivo (30 y 70 días postnatales): se aplicará a nivel de una de las extremidades inferiores un tensiómetro específicamente diseñado (Pluto Veterinari Medical Monitor, Bionics Corp)
- Evaluación de parámetros ecocardiográficos y vasculares (30 días gestacionales, +30 y +70 días postnatales) a través de la utilización de un ecógrafo específico para cardiología (Vivid Q de General Electric Healthcare), mediante sonda sectorial de 4.5- 11.5 MHz y una sonda lineal 6-13 MHz. Ésta se realizará previa administración de Ketamina + Xilacina (35 mg/kg + 5mg / kg) como medicación preanestésica. Como manteniendo anestésico se administrará Isoflurano por vía inhalatoria (Forane®, Abbott; 3% en la inducción anestésica y de 1,5-2% en el mantenimiento anestésico, con oxígeno a 2 litros/minuto). Una vez conseguido el nivel anestésico deseado se realizará ecocardiografía transcutánea. Posteriormente a su adquisición se realizará un análisis off-line de las imágenes adquiridas con el fin de medir parámetros ecocardiográficos funcionales y análisis de la textura ecográfica de la pared vascular aórtica.

B). Evaluación de parámetros neurológicos:

- En periodo neonatal (+1P): se realizará una exploración general, evaluándose la motricidad, la locomoción, tonicidad, reflejos así como la deglución y la sensibilidad olfativa (test adaptado de Derrick et al., 2009).
- A largo plazo (+70P) se aplicarán tres pruebas de evaluación funcional ampliamente aplicados en rata como el *Open Field Behavioral Test* y *Object Recognition Task* con el objetivo de evaluar posibles alteraciones a nivel del neurocomportamiento, de la memoria y aprendizaje. Para la ejecución del *Open Field Behavioral Test* y el *Object Recognition Task* se utilizará una superficie que será nueva para el animal y que está especialmente diseñada para conejos y disponible en el estabulario de Farnacia. En el *Open Field* el animal se dejará en el interior de la superficie evaluándose el comportamiento global (tiempo de permanencia en el interior del campo vs. tiempo de permanencia en la periferia). En el *Object Recognition Task* se introducirán en el interior del campo abierto dos objetos. En una primera fase ambos objetos presentarán las mismas características visuales (objetos familiares), mientras que en la segunda fase uno de los objetos presentará características visuales diferentes (objeto nuevo). Todos los tests neurológicos serán filmados y evaluados off-line. De forma específica, se evaluarán los tests neurológicos aplicados a los +70P (*Open Field* y *Object*) mediante el software Smart.

**Sacrificio y obtención de muestras:**

La pauta de evaluación estructural en el periodo postnatal será la siguiente:

Obtención de muestras: se obtendrán muestras cerebrales de todas las crías independientemente del grupo de intervención, tanto a día +1 como día +70

postnatales en función del protocolo de seguimiento asignado. Una vez se haya aplicado el test de evaluación funcional correspondiente se procederá al sacrificio de los animales. En las crías a + 1P el sacrificio se realizará por decapitación, mientras que en las crías de + 70P se realizará mediante la administración de una sobredosis de pentobarbital 200mg / kg ev, con administración previa de Ketamina + Xilacina (35mg /kg + 5mg / kg) como medicación preanestésica. Posteriormente se procederá a la decapitación del animal. En ambos momentos se procederá a la obtención del SNC y el corazón mediante perfusión intracardiaca de 20cc de PBS 12:01 M + 20cc Formalina 10% previa canulación del ventrículo izquierdo. A continuación se realizará la craneotomía con extracción del tejido cerebral. En ambos momentos además del tejido cerebral se extraerán muestras de tejido de diferentes órganos para evaluar posibles efectos tóxicos de las terapias administradas. Extraerán muestras de: hígado, riñón, intestino, corazón y sangre.

#### **Supervisión de los animales:**

Después de la llegada del animal al estabulario, así como después de iniciar el protocolo de RCIU y terapia intraútero o durante el seguimiento a largo plazo de las crías se vigilará la presencia de cualquiera de los siguientes signos de discomfort: 1. vocalizaciones; 2. disminución o ausencia de movimientos; 3. irritabilidad; 4. disminución o ausencia de ingesta; 5. la presencia de diarrea; 6. agresividad. La valoración de cada uno de los síntomas descritos se realizará de forma individualizada y se puntuará de forma independiente: 0 puntos - ausencia total de los síntomas; 1 punto - aparición ocasional del síntoma (observado sólo unas pocas veces); 2 puntos - aparición frecuente del síntoma; 3 puntos - presencia constante del síntoma. Un valor superior o igual a 12

obtenido se considerará criterio de punto y final y se procederá al sacrificio del animal. Asimismo, la presencia de un animal comatoso, presencia de automutilaciones o pérdida de peso >20% se considerará también como criterio de punto final con independencia del valor obtenido en el protocolo de supervisión de los animales. De forma específica, después de la realización de la cesárea, en el periodo postnatal inmediato, se controlarán las crías mediante la valoración de la coloración de piel, la presencia o no actividad y la presencia de llanto persistente. Ante la sospecha de una mala alimentación (ausencia de actividad, llanto persistente, coloración no rosácea) se procederá a la administración de un suplemento alimenticio. Ante la sospecha de enfermedad (persistencia de llanto a pesar de la correcta alimentación, ausencia de movimientos) se procederá al sacrificio de la cría.

## **19. MODELO DE CRECIMIENTO INTRAUTERINO RETARDADO POR RESTRICCIÓN DE INGESTA EN CONEJA GESTANTE.**

Miriam Illa Armengol

Maria Dolores Gomez Roig.

Eduard Gratacos Solsona.

Centro de Investigación en Medicina Fetal y perinatal, IDIBAPS

BCNatal (Centro de Medicina Maternofetal y Neonatal Barcelona)

Hospital Clínico y Hospital San Juan de Dios, Universidad de Barcelona

Febrero 2015

## **Animales de experimentación**

Se utilizan conejas gestantes de > 32 semanas de vida, de unos 5 kg de peso. Unas conejas se randomizarán a recrear la restricción de crecimiento (RCIU) mediante restricción de ingesta mientras que otras serán randomizadas a dieta normal. Los sujetos de estudio serán las crías.

## **Procedimientos**

Todos los procedimientos con animales se realizan siguiendo la normativa legal. El procedimiento experimental ha sido diseñado por personal homologado y es supervisado por el responsable del Área de Experimentación Animal, aprobado por la Comisión de Investigación del Centro.

## **Inducción RCIU:**

Las conejas gestantes llegarán al animalario y se mantendrán en jaulas separadas, con ciclos de oscuridad y luz durante 12 horas con libre acceso a agua y pienso sin antibiótico (Purina Laboratory Chow®). Después de un periodo de aclimatación mínimo de 72 horas, se procederá a la cuantificación de la cantidad de pienso medio ingerido por coneja durante mínimo 7 días. Posteriormente se procederá randomizarán las conejas a: RCIU vs. Control. En ese mismo momento se realizará la asignación aleatoria de cada una de las gestantes en los diferentes grupos de intervención (A, B, C y D). En el subgrupo de conejas gestantes randomizadas a recrear el RCIU, se procederá a la reducción de la ingesta del 70% respecto al consumo basal (aproximadamente unos 100-150 g de pienso por coneja y día). Esta reducción se iniciará a los 22 días de gestación y se mantendrá hasta el momento del parto que se dejará evolucionar a parto espontáneo (a término: 31 días de gestación). En el subgrupo de conejas randomizadas a grupo control (grupo D)

se seguirá la misma pauta anteriormente detallada aunque la administración del pienso estándar será ad libitum. En el posparto inmediato se tomará especial cuidado del mantenimiento de la temperatura de las crías así un control del estado de las crías. Se recogerán los datos antropométricos de todos los conejos supervivientes.

### **Randomización a grupos terapéuticos**

Los animales se distribuirán de forma aleatoria en grupos terapéuticos según los fármacos o técnicas a estudiar:

- Grupo A: conejas gestantes randomizadas a recrear el modelo de RCIU sin terapia (RCIU puros).
- Grupo B: conejas gestantes con RCIU randomizadas a terapia perinatal con Omega3. La administración del omega 3 iniciará en el mismo día de la inducción de RCIU (22 días de gestación) y se mantendrá hasta el destete (30 días de vida). La administración se realizará por vía oral a razón de 200 mg/kg/día.
- Grupo C: conejas gestantes con RCIU randomizadas a estimulación postnatal. En el subgrupo de crías randomizadas a estimulación postnatal, se procederá a aumentar el enriquecimiento ambiental de los sujetos mediante un aumento del acercamiento del investigador al animal así como la utilización de juguetes o materiales que favorezcan el enriquecimiento ambiental. Se iniciará a partir de los 30 días de vida.
- Grupo D: conejas gestantes con dieta normal (controles puros).

### **Seguimiento a largo plazo de las crías:**

A). Del total de crías derivadas de los diferentes protocolos de intervención se realizará una evaluación funcional de los parámetros cardiovasculares:

- Presión sanguínea mediante un método no invasivo (30 y 70 días postnatales): se aplicará a nivel de una de las extremidades inferiores un tensiómetro específicamente diseñado (Pluto Veterinari Medical Monitor, Bionics Corp).
- Evaluación de parámetros ecocardiográficos y vasculares (30 días gestacionales, +30 y +70 días postnatales) a través de la utilización de un ecógrafo específico para cardiología (Vivid Q de General Electric Healthcare), mediante sonda sectorial de 4.5- 11.5 MHz y una sonda lineal 6-13 MHz. Ésta se realizará previa administración de Ketamina + Xilacina (35mg / kg + 5mg / kg) como medicación preanestésica. Como manteniendo anestésico se administrará Isoflurano por vía inhalatoria (Forane®, Abbott; 3% en la inducción anestésica y de 1,5-2% en el mantenimiento anestésico, con oxígeno a 2 litros/minuto). Una vez conseguido el nivel anestésico deseado se realizará ecocardiografía transcutánea. Posteriormente a su adquisición se realizará un análisis *off-line* de las imágenes adquiridas con el fin de medir parámetros ecocardiográficos funcionales y análisis de la textura ecográfica de la pared vascular aórtica.

B). Evaluación de parámetros neurológicos:

- En periodo neonatal (+1P): se realizará una exploración general, evaluándose la motricidad, la locomoción, tonicidad, reflejos así como la deglución y la sensibilidad olfativa (test adaptado de Derrick et al., 2009).
- A largo plazo (+70P) se aplicarán tres pruebas de evaluación funcional ampliamente aplicados en rata como el *Open Field Behavioral test* y *Object Recognition Task* con el objetivo de evaluar posibles alteraciones a nivel del

neurocomportamiento, de la memoria y aprendizaje. Para la ejecución del *Open Field Behavioral test* y el *Object Recognition Task Object* se utilizará una superficie que será nueva para el animal y que está especialmente diseñada para conejos y disponible en el estabulario de Farnacia. En el *Open Field Behavioral test* el animal se dejará en el interior de la superficie evaluándose el comportamiento global (tiempo de permanencia en el interior del campo frente a tiempo de permanencia en la periferia). En el *Object Recognition Task Object* se introducirán en el interior del campo abierto dos objetos. En una primera fase ambos objetos presentarán las mismas características visuales (objetos familiares), mientras que en la segunda fase uno de los objetos presentará características visuales diferentes (objeto nuevo). Todos los tests neurológicos serán filmados y evaluados off-line. De forma específica, se evaluarán los tests neurológicos aplicados a los +70P (*Open Field Behavioral test* y *Object Recognition Task Object*) mediante el software *Smart*.

### **Sacrificio y obtención de muestras**

La pauta de evaluación estructural en el periodo postnatal será la siguiente:

Obtención de muestras: se obtendrán muestras cerebrales de todas las crías independientemente del grupo de intervención, tanto a día +1 como día +70 postnatales en función del protocolo de seguimiento asignado. Una vez se haya aplicado el test de evaluación funcional correspondiente se procederá al sacrificio de los animales. En las crías a + 1P el sacrificio se realizará por decapitación, mientras que en las crías de + 70P se realizará mediante la administración de una sobredosis de pentobarbital 200 mg/kg ev, con administración previa de ketamina + xilacina (35mg /kg + 5mg / kg) como

medicación preanestésica. Posteriormente se procederá a la decapitación del animal. En ambos momentos se procederá a la obtención del SNC y el corazón mediante perfusión intracardiaca de 20cc de PBS 12:01 M + 20cc Formalina 10% previa canulación del ventrículo izquierdo. A continuación se realizará la craneotomía con extracción del tejido cerebral. En ambos momentos además del tejido cerebral se extraerán muestras de tejido de diferentes órganos para evaluar posibles efectos tóxicos de las terapias administradas. Extraerán muestras de: hígado, riñón, intestino, corazón y sangre.

### **Supervisión de los animales:**

Después de la llegada del animal al estabulario, así como después de iniciar el protocolo de RCIU y terapia intraútero o durante el seguimiento a largo plazo de las crías se vigilará la presencia de cualquiera de los siguientes signos de disconfort: 1. vocalizaciones; 2. disminución o ausencia de movimientos; 3. irritabilidad; 4. disminución o ausencia de ingesta; 5. la presencia de diarrea; 6. agresividad. La valoración de cada uno de los síntomas descritos se realizará de forma individualizada y se puntuará de forma independiente: 0 puntos - ausencia total de los síntomas; 1 punto - aparición ocasional del síntoma (observado sólo unas pocas veces); 2 puntos - aparición frecuente del síntoma; 3 puntos - presencia constante del síntoma. Un valor superior o igual a 12 obtenido se considerará criterio de punto y final y se procederá al sacrificio del animal. Asimismo, la presencia de un animal comatoso, presencia de automutilaciones o pérdida de peso >20% se considerará también como criterio de punto final con independencia del valor obtenido en el protocolo de supervisión de los animales.

**20. MODELO DE CRECIMIENTO INTRAUTERINO RETARDADO  
RESTRICCIÓN POR REDUCCIÓN INGESTA DE PROTEÍNAS EN RATA  
GESTANTE.**

Miriam Illa Armengol

Maria Dolores Gomez Roig.

Eduard Gratacos Solsona.

Centro de Investigación en Medicina Fetal y perinatal, IDIBAPS

BCNatal (Centro de Medicina Maternofetal y Neonatal Barcelona)

Hospital Clínico y Hospital San Juan de Dios, Universidad de Barcelona

Febrero 2015

## **Animales de experimentación**

Se utilizan ratas Wistar gestantes de 200-300g de peso. Las ratas gestantes se randomizarán en los siguientes grupos de intervención: i.- grupo en el que se realizará una reducción en la ingesta de proteínas (9% caseína); ii.- grupo de ratas gestantes que serán randomizadas al grupo control (18% caseína - durante toda la gestación).

## **Procedimientos**

Todos los procedimientos con animales se realizan siguiendo la normativa legal. El procedimiento experimental ha sido diseñado por personal homologado y es supervisado por el responsable del Área de Experimentación Animal, aprobado por la Comisión de Investigación del Centro.

## **Inducción del RCIU**

Las ratas gestantes llegarán al estabulario a lo largo del día gestacional 2-3 días y mantendrán en jaulas separadas, con ciclos de oscuridad y luz durante 12 horas con libre acceso a agua y pienso sin antibiótico (Purina Laboratory Chow®). Inmediatamente a la llegada se procederá randomizarán las ratas a: RCIU vs. Control. En el subgrupo de ratas gestantes randomizadas a recrear el RCIU, se procederá a la administración del pienso con contenido bajo en proteínas (9% caseína, Diet Services, Cambridge, UK), el cual ha mostrado ser seguro y eficaz para los objetivos que se desean conseguir (Langley et al., 1994; McMillen et al., 2005), administrándose desde el día gestacional 3 al 22. Fuera de los periodos de experimentación anteriormente detallados, en las ratas gestantes así como en sus crías se administrará el pienso estándar utilizado en el estabulario de San Juan de Dios (2014 Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet, Harlan, Spain). Se aplicará el protocolo

según lo descrito hasta el momento en el que se produzca el parto espontáneo (término= 22 días). Después del parto se dejará libre acceso al pienso estándar del estabulario a todas las ratas puérperas. Durante los primeros 20 días, las crías se mantendrán con lactancia exclusiva y pasado este tiempo se dará acceso libre a pienso y agua. En el subgrupo de ratas randomizadas al grupo control se seguirá la misma pauta anteriormente detallada aunque con la administración del pienso estándar ad libitum (pienso que contiene las mismas concentraciones de nutrientes que la dieta con reducción de proteínas pero con una concentración normal de proteínas -18%-). En ambos grupos, se tomará especial cuidado a las crías mantenimiento de la temperatura así un control de su estado general. En etapa neonatal (+1 día postnatal) se recogerán los datos antropométricos de todas las crías supervivientes y se identificarán mediante marcaje a nivel de la oreja según procedimiento habitual.

### **Seguimiento a largo plazo de las crías**

Del total de crías derivadas de los diferentes protocolos de intervención se realizará una evaluación funcional de los parámetros cardiovasculares, tanto a corto (1 y 30 días postnatales), como a largo plazo (70 días postnatales).

Estos incluyen:

- Presión sanguínea mediante un método no invasivo: se colocará en la cola de las crías un brazalete de pletismografía específicamente diseñado (CODATM, KentScientific, USA). Se utilizará específicamente este método de evaluación ya que consigue medir de una manera fiable la presión arterial sin utilizar el choque térmico como método de evaluación de la presión arterial, reduciendo el nivel de estrés de los animales. Además, previa a la toma de la presión se procederá a la inmovilización del animal a una

temperatura controlada a 27°C entre 30 minutos -1 hora para habituar al animal y disminuir el estrés asociado.

- Evaluación de parámetros ecocardiográficos y vasculares a través de la utilización de un ecógrafo específico para cardiología (Vivid Q de General Electric Healthcare), mediante sonda sectorial de 4.5- 11.5 MHz y una sonda lineal 6-13 MHz. Ésta se realizará previa administración por vía inhalatoria de Isoflurano (Forane®, Abbott; 3% con oxígeno a 2 litros/minuto).
- Posteriormente a su adquisición se realizará un análisis off-line de las imágenes adquiridas con el fin de medir: fracción de eyección, gasto cardiaco, índice de esfericidad, velocidades de llenado ventricular y ratio E / A, tiempo de relajación isovolumétrica e índice de función miocárdica, función global anular (con modo-M y Doppler tisular), análisis de la deformación regional (*strain* y *strain-rate* mediante Doppler tisular y 2Dstrain), espesor y textura (mediante la metodología *Automatic Quantitative Ultrasound Analysis* (AQUA) de la pared vascular aórtica.

#### **Sacrificio y obtención de muestras:**

- Después del destete (20 días postparto) se procederá al sacrificio de las ratas puérperas mediante exanguinación (disección y extracción del corazón) previa administración de anestesia general profunda con Isoflurano (Forane®, Abbott; 3% con oxígeno a 2 litros/minuto).
- A los +1, 30 y 70 días postnatales: el total de crías serán randomizadas a estos tres momentos diferentes, en el que se sacrificarán bajo anestesia general después de la obtención de los parámetros ecocardiográficos, así como evaluación de la Tensión arterial (+70P). Ésta se realizará mediante la administración por vía inhalatoria con isoflurano (Forane®, Abbott; 3% con

oxígeno a 2 litros/minuto). Una vez conseguido el nivel anestésico deseado se procederá a la toracotomía. Una vez identificado el corazón se procederá a la obtención de sangre mediante punción transcardíaca con posterior obtención del corazón y aorta.

### **Supervisión de los animales:**

- En la llegada de las gestantes al estabulario se vigilará la ingesta así como la presencia de signos de discomfort (irritabilidad y vocalizaciones).
- Después de iniciar el protocolo de restricción de proteínas se vigilará la presencia de signos de discomfort:
  1. Vocalizaciones.
  2. Disminución o ausencia de movimientos.
  3. Irritabilidad.
  4. Disminución o ausencia de ingesta; y otros signos como:
  5. La presencia de diarrea;
  6. Agresividad.

La valoración de cada uno de los síntomas descritos se hará de forma individual y se puntuará de forma independiente:

0 puntos - ausencia total del síntoma;

1 punto - aparición ocasional del síntoma (observado sólo unas pocas veces);

2 puntos - aparición frecuente del síntoma;

3 puntos - presencia constante del síntoma.

Un valor superior o igual a 12 obtenido se considerará criterio de punto y final y se procederá al sacrificio del animal.

- En el período postnatal inmediato se controlarán las crías mediante la valoración de la coloración de piel, la presencia o no de actividad y la presencia de llanto persistente.

Ante la sospecha de una mala alimentación (ausencia de actividad, llanto persistente, coloración no rosácea) se procederá a la administración de un suplemento alimenticio. Ante la sospecha de enfermedad (persistencia de llanto a pesar de la correcta alimentación, ausencia de movimientos) se procederá al sacrificio de la cría mediante la exanguinación previa sedación.

## **21. MODELO EXPERIMENTAL DE CÁMARA CICLADORA DE OXÍGENO**

Isabel Torres-Cuevas

Elena Cubells

Máximo Vento

Javier Escobar Cubiella

Grupo de Investigación Perinatal.

Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia.

## **Cámara cicladora de oxígeno**

Nuestro grupo dispone de una cámara cicladora de oxígeno (O<sub>2</sub>) estanca para estudios *in vivo* de hipoxia e hiperoxia en roedores. La cámara es de diseño propio y con ella se puede modificar la concentración de O<sub>2</sub> en un rango que va desde el 0.5% hasta el 99% de O<sub>2</sub>. El tiempo en alcanzar la máxima concentración es de alrededor 10 minutos, esta es una de las principales características que dispone superando los tiempos y rangos de concentración que ofrecen las cámaras comerciales disponibles las cuales no suelen superar el 95% de O<sub>2</sub>, tardando varias horas en alcanzar la concentración máxima. Otra mejora de nuestra cámara con respecto a las comerciales es la incorporación de un sistema de doble entrada y de guantes estériles adaptados para poder manipular y monitorizar a los ratones en el interior la cámara manteniendo las concentraciones experimentales de O<sub>2</sub> (figura 1). También hemos incorporado una cámara de video infrarroja que permite realizar la toma de fotos seriadas en el interior de la cámara en todo momento, tanto en ambiente diurno como nocturno, para controlar el estado de los animales durante el procedimiento experimental. Con el diseño de la cámara vamos a poder tener un registro de los valores de temperatura, presión, humedad y FiO<sub>2</sub> en todo momento que ayudará a la reproducibilidad de los experimentos.

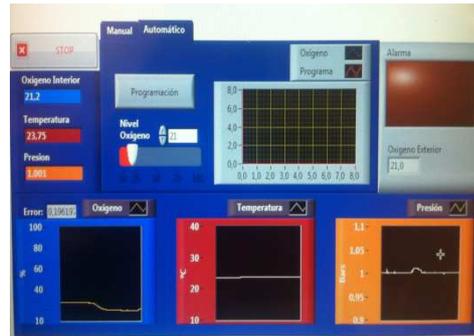


Figura 1. Cámara cicladora de oxígeno

Nuestro grupo también tiene acceso a una cámara estanca cicladora de  $O_2$  para cultivos celulares para la realización de estudios *in vitro* de hipoxia e hiperoxia. Los rangos de dicha cámara van del 0,1% al 90% de  $O_2$ . La cámara se encuentra situada en las instalaciones del Servicio de Soporte a la Investigación (SCSIE) de la Universidad de Valencia.

### **Modelo de experimentación**

Se utilizan hembras de ratones C57BL/6 las cuales se ponen a cruzar a partir de la sexta semana de vida y se les realiza la prueba del tapón vaginal para confirmar el embarazo. Es necesario tener controlado el día del tapón positivo porque en el día 18 de gestión se introducirán a la hembra dentro de la cámara de oxigenación controlada.

Nuestro grupo tiene validado y optimizado un modelo de transición fetal-neonatal en condiciones de hipoxia. En este modelo sometemos a la hembra gestante de ratón a una hipoxia moderada ( $FiO_2$  del 14%) la noche previa al nacimiento (G18), de tal manera que las crías nacen en condiciones similares a las intrauterinas. Analizando la captura seriada de fotos seriadas durante la noche, identificamos el momento exacto del parto para poder dejar a las crías

8h en esas condiciones antes de proceder con la transición de la crías a oxígeno ambiental ( $FiO_2$  del 21%). Otro grupo antes de proceder a la transición del oxígeno ambiental será sometido a un insulto con el 99% oxígeno simulando la reoxigenación durante un breve periodo de tiempo.

Las crías de ratón serán evaluadas el día uno (P1) y siete (P7) después de nacimiento, manteniéndose en la cámara en condiciones de oxigenación ambiental.

Las muestras de tejido son extraídas y procesadas inmediatamente tras el sacrificio de los animales. La técnica utilizada es la decapitación con anestesia previa de ketamina/xilacina administrada vía intraperitoneal. Para los estudios metabólicos, de expresión génica y proteica las muestras se congelarán en nitrógeno líquido y se almacenarán a  $-80^{\circ}C$  hasta su procesado. Para los estudios histológicos los ratones se perfunden (perfusión intracardíaca) y los tejidos son fijados con PFA 4% y se guardan en PBS azida sódica hasta su procesamiento.

Mediante el análisis metabólico a nivel plasmático y cerebral hemos comprobado que las crías sufren la adaptación metabólica a las condiciones experimentales sin observarse ninguna alteración cerebral.

Con este modelo hemos puesto a punto la extracción y procesamiento de tejidos de crías de 1 (P1) y 7 (P7) días tanto para determinaciones bioquímicas como histológicas.



Figura 2. Crías de ratón P1

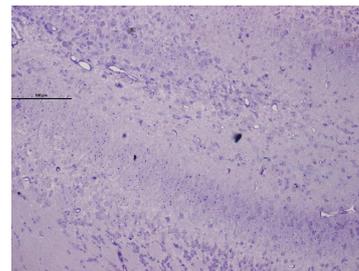
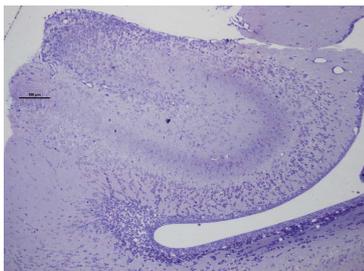
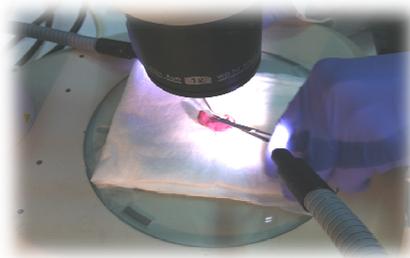


Figura 3. Tinción de Nissl en cerebro de ratón P1 nacido en hipoxia ( $FiO_2$  del 14%).

## **22. MODELO EXPERIMENTAL DE SÍNDROME ALCOHÓLICO FETAL EN PEZ CEBRA**

Javier Joya Cecilia

Cristina Pujades Corbi

Oriol Vall Combelles

Oscar García Algar

Unidad de investigación de la infancia y el entorno

Instituto del Hospital del Mar de Investigaciones Médicas. Barcelona

Red de Salud Materno Infantil y del Desarrollo

Enero 2012.

Revisado 2015

## **Animales de experimentación**

Se utilizan embriones de pez zebra (*Danio rerio*) que se obtienen mediante cruce de adultos en el estabulario de animales acuáticos del Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB) mediante procesos estandarizados. Todas las líneas se mantienen como líneas puras. Para evaluar el desarrollo del sistema nervioso central utilizaremos las líneas transgénicas Mü4127 que expresa MCherry de forma específica en los rombómeros r3 y r5. La línea Tg[neurog1:GFP] es un marcador de especificación neuronal. La línea Tg[isl1:GFP] expresa GFP en los núcleos del romboencéfalo y es un marcador de motoneuronas. Tg[isl3:GFP] (también llamada isl2b) expresa GFP en las neuronas sensoriales aferentes. La línea Tg[HuC:KAEDE] proporciona uno de los marcadores iniciales de diferenciación neuronal tanto en el sistema nervioso central como también el periférico.

## **Procedimientos**

Todos los procedimientos con animales se realizan siguiendo la normativa legal. El procedimiento experimental ha sido diseñado por personal homologado y es supervisado por el responsable del Área de Experimentación Animal, aprobado por la Comisión de Investigación del Centro.

## **Tratamientos con alcohol**

- Una vez obtenidos los embriones de pez cebra, estos se mantienen en medio E3 y se mantienen en estufa a 28.5°C hasta su análisis. Para producir el fenotipo característico del síndrome alcohólico fetal el tratamiento con etanol se inicia a las 4 horas post-fertilización (hpf).
- Los embriones se tratan con 2.5% (420mM) de alcohol (VWR, Radnor). Las disoluciones se preparan diluyendo alcohol absoluto en medio E3.

- Los animales se transfieren a placas de 6 pocillos (Costar 3599, Corning Inc., NY) a una densidad de 10 embriones por pocillo.
- Para minimizar el stress que ello pudiera causar, los embriones no se decorionan ya que en estudios previos se ha observado que el alcohol atraviesa sin dificultad el corion.
- El tratamiento con alcohol se realiza de 4 a 24 hpf. Durante este periodo, las placas se sellan con Parafilm para evitar la evaporación del alcohol.
- Una vez finalizado el tratamiento, la solución alcohólica se desecha y se lava cada pocillo 3 veces con E3 para eliminar los restos de alcohol.

### **Grupos terapéuticos**

Los animales se distribuyen de forma aleatoria en grupos terapéuticos según los fármacos o técnicas a estudiar.

### **Bibliografía**

- D'Amico D, Estivill X, Terriente J. Switching to zebrafish neurobehavioral models: The obsessive-compulsive disorder paradigm. *Eur J Pharmacol* 2015;24:242-3.
- [McGraw HF, Nechiporuk A and Raible DW. Zebrafish dorsal root ganglia neural precursor cells adopt a glial fate in the absence of neurogenin1. *J Neurosci* 2008;28:12558-69.
- [3] Higashijima S, Hotta Y and Okamoto H. Visualization of cranial motor neurons in live transgenic zebrafish expressing green fluorescent protein under the control of the islet-1 promoter/enhancer. *J Neurosci* 2000;20:206-18.

- Sapede D, Dyballa S and Pujades C. Cell lineage analysis reveals three different progenitor pools for neurosensory elements in the otic vesicle. *J Neurosci* 2012;32:16424-34.
- Sato T, Takahoko M and Okamoto H. HuC:Kaede, a useful tool to label neural morphologies in networks in vivo. *Genesis* 2006;44: 136-142.
- Joya X, Garcia-Algar O, Vall O, Pujades C. Transient exposure to ethanol during zebrafish embryogenesis results in defects in neuronal differentiation: an alternative model system to study FASD. *PLoS One* 2014;9:e112851.
- Blader P and Strahle U. Ethanol impairs migration of the prechordal plate in the zebrafish embryo. *Dev Biol* 1998;201:185-201.

## **23. MODELO DE OBESIDAD Y DIABETES INDUCIDA CON ESTREPTOZOTOCINA Y NICOTINAMIDA EN RATAS**

María Dolores Mesa García

Ángel Gil Hernández

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II

Instituto de Nutrición y Tecnología De Alimentos “José Mataix”

Universidad de Granada

Red de Salud Materno Infantil y del Desarrollo

Abril 2015

Este modelo utiliza la protección parcial que ejerce la nicotinamida frente al efecto  $\beta$ -citotóxico de la estreptozotocina, con el objetivo de crear un síndrome diabético experimental en ratas adultas que es semejante a la Diabetes Mellitus (DM) del humano, ya que la respuesta de la insulina a la glucosa y sulfonilureas es similar a la DM tipo 2. Este modelo experimental fue desarrollado por Masiello et al. (1998). Este autor considera las ratas diabéticas si la concentración en plasma en ayunas es 160-180 mg/dl, aunque otros autores señalan una cifra de corte mayor a 200 mg/dL.

### **Animales de experimentación**

Se utilizan ratas Wistar machos (Harlan Laboratories S.A.).

Los animales se transportan al Animalario del Centro de Instrumentación Científica situado en el Centro de Investigaciones Biomédicas, donde se mantienen durante 4-5 días en cuarentena. Las ratas se pesan y se distribuyen homogéneamente en función del peso en los grupos experimentales necesarios. Los animales se colocan en jaulas: 4-6 animales por jaula, en una sala con temperatura controlada a 22°C y con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h y se alimentarán con dieta *chow* para ratas.

### **Procedimientos**

Todos los procedimientos con animales se realizan siguiendo la normativa legal. Todos los proyectos deben ser aprobados por el comité de ética de la Universidad de Granada.

### **Inducción de la diabetes**

Para inducir la diabetes se inyecta intraperitonealmente una dosis única de 230 mg/kg de nicotinamida (Sigma Ref. N3376) disuelta en suero salino, 15 min antes de inyectarles de forma intravenosa, una dosis única de 65 mg/kg de

estreptozotocina (Sigma Ref. S0130) disuelta en suero salino de forma extemporánea. De esta forma los animales desarrollan un síndrome diabético experimental.

### **Sacrificio de los animales**

Los animales se sacrifican tras haber estado recibiendo el suplemento correspondiente durante el tiempo estipulado.

La anestesia (ketamina/xilacina: 90 mg/kg de ketamina y 10 mg/kg de xilacina) se administra intraperitoneal. Los animales se mantienen durante 3 min en oscuridad y tranquilos para favorecer el efecto de la anestesia. Una vez dormidas, se les abre la cavidad abdominal y se pincha la arteria aorta, a nivel de bifurcación de las iliacas para extraer la sangre. De esta forma se suelen extraer una media de 5-8 ml de sangre que se recoge en tubos con EDTA como anticoagulante (para la obtención de plasma) o sin anticoagulante (para la obtención de suero). La sangre se conserva en un baño de hielo hasta que se centrifuga (1800 x g durante 15 min a 4 °C) para separar el suero, plasma, las células blancas y las células rojas. Todas estas muestras con congeladas inmediatamente a -80 °C hasta su posterior análisis.

Para la determinación de las hormonas gastrointestinales se añaden de inhibidores de proteasas a la sangre (con EDTA) (Pefabloc -Roche-, inhibidor del DPP-IV -Linco- y cocktail de inhibidores de proteasas -Roche-). La sangre se centrifuga a 1800 x g durante 15 min a 4 °C y el plasma se recoge y congela a -80 °C hasta su posterior análisis.

Tras la extracción de sangre se procede a la obtención de los órganos necesarios, que deben ser lavados con solución salina (0.9 %), secados, pesados, divididos en trozos de tamaño adecuado y congelados en nitrógeno

líquido y posteriormente a -80 °C hasta su análisis. Se suelen tomar muestras de: hígado, riñones, páncreas, corazón, tejido aórtico, músculo, bazo, cerebro, ojos, tejido adiposo, o cualquier tejido que haga falta.

### **Grupos terapéuticos o de suplementación**

Los animales se distribuyen de forma aleatoria, pareándolos por peso, en grupos terapéuticos según los compuestos, fármacos o alimentos a estudiar.

### **Mediciones realizadas**

Se toman muestras de sangre y orina en las que se pueden determinar los biomarcadores que se detallan a continuación o cualquier otro biomarcador que se desee determinar en cualquier órgano que se desee extraer:

- Recolección de muestras para el estudio histológico  
Se recogen en formalina (formaldehído al 4%) lo antes posible
- Bioquímica general en plasma  
Glucosa, Colesterol Total, Colesterol de LDL, Colesterol de HDL y Triglicéridos en plasma, mediante kits espectrofotométricos.
- Determinación del perfil de ácidos grasos en plasma por cromatografía de gases (Lepage y Roy, 1986)
- Biomarcadores de estrés oxidativo y estado antioxidante
  - F2-isoprostanos como marcador de oxidación lipídica en orina de 24 h (ELISA)
  - 8-hydroxi-2'-deoxiguanosina como marcador de oxidación del DNA en orina de 24 h (ELISA).
  - Lipoproteína de baja densidad (LDL) oxidada circulante in vivo en plasma (ELISA).

- Vitaminas antioxidantes en plasma (tocoferol, beta-caroteno, retinol y coenzima Q) por HPLC-MS (Battino et al., 2004).
- Marcadores inflamatorios y de daño endotelial (Waterboer et al., 2006)
  - Endotelina; Adiponectina y Resistina (Panel Luminex) en plasma
  - E-selectina, VCAM-1, ICAM-1 y Mieloperoxidasa (panel Luminex) en plasma
  - Interleukinas: IL-6 y IL-8 y TNF- $\alpha$  (Panel Luminex) en plasma.
- Hormonas gastrointestinales en plasma (Luminex X-Map)
  - Insulina
  - Grelina activa
  - Amilina activa
  - GIP total (péptido inhibidor del pepsinógeno)
  - GLP-1 activo (péptido análogo del glucagón)
  - PP (polipéptido pancreático)
  - Péptido YY (PYY)
  - Colecistokinina (CCK)

## **Bibliografía**

- Masiello P, Broca C, Gross R, Roye M, Manteghetti M, Hillaire-Buys D, Novelli M, Ribes G. Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes*. 1998; 47:224-9.
- Lepage, Roy CC. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res* 1986; 27:114-20.
- Battino M, Leone L, Bompadre S. High-performance liquid chromatography-EC assay of mitochondrial coenzyme Q9, coenzyme Q9H2, coenzyme Q10,

coenzyme Q10H2, and vitamin E with a simplified on-line solid-phase extraction. *Methods Enzymol* 2004; 378:156-62.

- Waterboer T, Sher P, Pawlita M. Suppression of non-specific binding in serological Luminex assays. *J Immunol Methods* 2006; 20:200-4.

## **24. MODELO DE ALERGENICIDAD A PROTEÍNAS ALIMENTARIAS O SUS HIDROLIZADOS EN COBAYAS**

María Dolores Mesa García

Ángel Gil Hernández

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II

Instituto de Nutrición y Tecnología De Alimentos “José Mataix”

Universidad de Granada

Red de Salud Materno Infantil y del Desarrollo

Abril 2015

El método seguido será el de la Pharmacopea de EEUU. La administración de la proteína en forma nativa por vía intravenosa no debe producir choque anafiláctico en animales que hayan recibido previamente el hidrolizado por vía oral. De la misma forma, la inyección del hidrolizado no debe producir reacción en animales que previamente hayan tomado la proteína nativa.

### **Procedimientos**

Todos los procedimientos con animales se realizan siguiendo la normativa legal. Todos los proyectos deben ser aprobados por el comité de ética de la Universidad de Granada.

A los animales se les administra por vía oral una proteína intacta y un hidrolizado para sensibilizarlos. Posteriormente, se les administrarán por vía intravenosa la proteína o el hidrolizado para comprobar si se han sensibilizado previamente y si el contacto con ellos provoca una reacción anafiláctica (según el método de la Pharmacopea de EEUU para la evaluación de la alergenicidad de una proteína)

### **Animales de experimentación**

Se utilizan cobayas macho de entre 200 y 250 g de peso de la raza Dunkin-Hartey, provenientes de los laboratorios Harlan (Barcelona).

Los animales se transportan al Animalario del Centro de Instrumentación Científica situado en el Centro de Investigaciones Biomédicas, donde se colocaran en jaulas con 2-3 animales, en una sala con temperatura controlada a 22°C y con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h y se alimentarán con dieta chow para cobayas (2040 Harlan, Barcelona) ad libitum, que carezca de proteínas de origen lácteo y de arroz.

Los animales son recibidos en el Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada, y tras un periodo de cuarentena de 3-5 días para su adaptación a las condiciones ambientales se dividen en grupos para iniciar la intervención.

### **Sensibilización**

Los animales se dividen en grupos y se sensibilizan con la proteína o el hidrolizado correspondiente que se quiera evaluar:

- Grupo 1: 2 cobayas control que ingieren su dieta habitual y exclusivamente agua como bebida
- Grupo 2: 10 cobayas que ingieren su dieta habitual y toman 35 mg/ml de una proteína de referencia disuelta en el agua de bebida
- Grupo 3: 10 cobayas que ingieren su dieta habitual y toman 35mg/ml de hidrolizado de proteína disueltos en el agua de bebida

Durante los quince primeros días del experimento cada grupo será alimentado con la dieta sólida y el agua de bebida ad libitum que lleva disuelta la proteína o el hidrolizado correspondiente. En los días 15 a 22 del experimento se alimentarán sólo con la dieta sólida y agua. El día 22 se realizará la prueba de anafilaxia sistémica.

### **Prueba de anafilaxia**

Los animales serán anestesiados ligeramente con anestesia inhalatoria para que la intervención sea indolora. Los animales que han tomado la proteína completa se dividen en 2 grupos de 5 animales. Por vía intravenosa, se les administra la solución para inducir la anafilaxia: a un grupo (n=5) se les administran 0,5 ml de una solución que contenga la proteína hidrolizada y al otro grupo (n=5) se les administran 0.5 ml de una solución que contenga la

proteína completa. De la misma manera, los animales que recibieron el hidrolizado se dividen en dos grupos de 5 animales y se les administra, por vía intravenosa, 0.5 ml de la misma solución que contiene la proteína hidrolizada (n=5) o 0.5 ml de la solución que contiene la proteína completa (n=5). Las soluciones se preparan en solución salina con una concentración de 35 mg/ml de la proteína/hidrolizado.

Para la valoración del grado de respuesta se tiene en cuenta la siguiente escala:

- Ausencia de reacción: 0
- Dificultad para respirar, enrojecimiento del pabellón auditivo o enrojecimiento de los ojos: 1
- Los tres síntomas del nivel 1: 2
- Pérdida de control muscular: 3
- Convulsiones, coma: 4
- Muerte: 5

### **Valoración de resultados**

La ausencia de cualquier síntoma de anafilaxia indica que la proteína o el hidrolizado resultan inocuos. La presencia de cualquiera de estos síntomas indica que la proteína o el hidrolizado no son totalmente seguros y que podrían ocasionar reacciones alérgicas en algunas personas.

### **Bibliografía**

- Boza JJ, Jiménez J, Martínez O, Suárez MD, Gil A. Nutritional value and antigenicity of two milk protein hydrolysates in rats and guinea pigs. J Nutr. 1994;124:1978-86.

- Baró L, Guadix EM, Martinez-Augustin O, Boza JJ, Gil A. Serum amino acid concentrations in growing rats fed intact protein versus enzymatic protein hydrolysate-based diets. *Biol Neonate*. 1995;68:55-61.