

**UNIVERSIDAD:** Universidad Nacional de La Plata / Facultad de Ciencias Veterinarias / Cátedra de Animales de Laboratorio y Bioterio.

**COMITÉ ACADÉMICO:** Salud.

**TÍTULO DEL TRABAJO:** PRODUCCIÓN DE RATONES INMUNODEFICIENTES DESTINADOS A LA INVESTIGACIÓN DEL CÁNCER.

**AUTOR(ES):** Guido M. Principi, Juan E. Guzmán Cook

**EMAIL DE LOS AUTORES:** [gmpprincipi@fcv.unlp.edu.ar](mailto:gmpprincipi@fcv.unlp.edu.ar) / [juaneguzman@yahoo.com.ar](mailto:juaneguzman@yahoo.com.ar)

**PALABRAS CLAVES:** Producción de ratones inmunodeficientes. Animales libres de patógenos específicos, SPF. Barreras sanitarias.

## INTRODUCCIÓN

Cada animal de experimentación constituye un reactivo biológico, en el cual se debe controlar su pureza, sin olvidar que una posible contaminación, ya sea biótica o abiótica, produce variaciones en los resultados esperados u observados en el proceso experimental. Para llegar a conclusiones válidas, es fundamental el uso de animales de buena calidad que se mantengan bajo condiciones estandarizadas y definidas de acuerdo con normativas internacionales (3) (4). Estas condiciones no sólo llevan a los científicos a alcanzar resultados confiables, reproducibles y comparables, sino también a mejorar, desde el punto de vista ético, la calidad de vida de los animales de laboratorio (8).

De todas las especies, el ratón (*Mus musculus*) es el animal de experimentación más utilizado en todo el mundo. Esto se debe a que sus características biológicas y genéticas son totalmente conocidas, dando cuenta de esto el hecho del conocimiento de su mapa genético, que revolucionó la década del '90. Como consecuencia, se han desarrollado cepas de ratones que reproducen características especiales y que sirven para transpolar resultados en estudios pre-clínicos y en otras investigaciones, los ratones inmunodeficientes son un claro ejemplo y de gran valor científico.

El uso de animales inmunocomprometidos como modelo en el estudio de tumores humanos ha crecido en estos últimos años y han sido de vital importancia en el avance del conocimiento y en el desarrollo de nuevas terapias en el campo de la oncología (2). Debido a las características de su sistema inmune, estos ratones se deben producir y mantener bajo estrictas condiciones macro y microambientales, libres de virus, bacterias, parásitos y hongos, por lo cual se los califica de acuerdo con su condición sanitaria como animales libres de patógenos específicos (SPF). Estos microorganismos patógenos no sólo infectan fácilmente a estos ratones por su condición de inmunocomprometidos, sino que además, producen interferencias en los resultados de las pruebas en las que estos animales se usan como reactivo biológico.

Para producir ratones de laboratorio inmunodeficientes SPF se necesitan unidades diseñadas y construidas específicamente para tal fin con sistemas adecuados de barreras de bioseguridad, biocontención y prácticas de manejo eficientes para evitar el ingreso de microorganismos que puedan causar contaminaciones (5). También se deben implementar procedimientos de trabajo específicos, contar con personal debidamente entrenado y con sistemas especiales de alojamiento.

La cepa de ratones inmunodeficientes N:NIH(S)-*nu* es una de las más utilizadas en investigación biomédica especialmente en el campo de la oncología debido a que en estos individuos es posible realizar alotransplantes sin que sean rechazados (1). El Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP) es la única institución en la Argentina que desde el año 1995 reúne las condiciones para producir y mantener esta cepa SPF.

## **OBJETIVO**

Evaluar los aspectos constructivos, las prácticas de manejo y los protocolos de las actividades para la producción de ratones N:NIH(S)-*nu* inmunodeficientes, destinados a la investigación biomédica especialmente en el campo de la oncología.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Animales:**

La cepa que se produce es la N:NIH(S)-*nu*, la cual surge por una mutación en una colonia de ratones albinos Swiss exocriados en el Hospital Churchill de la ciudad de Glasgow en Escocia en el año 1962. En los animales homocigotas recesivos (*nu/nu*), **de ahora en adelante "nude"**, la mutación involucra un gen autosómico y recesivo asociado a la ausencia de pelo que induce a una disgenesia gonadal, aumento de la susceptibilidad a infecciones y a variaciones de temperatura. Los homocigotas dominantes (+/+) y los heterocigotas (+/*nu*) son inmunocompetentes y tienen su manto de pelo normal. El ratón "nude" presenta aplasia de timo la cual produce numerosos defectos del sistema inmunológico y, por ende una escasa respuesta a los antígenos timodependientes, debido a deficiencias cuantitativas y funcionales de las células T. Por estas características se utilizan como receptores para transplantes tumorales, ya que no se produce el rechazo de los mismos (6).

Durante casi las tres últimas décadas la técnica de transplante de tumores humanos en ratones inmunodeficientes "nude" se ha convertido en una herramienta indispensable para la investigación del cáncer, especialmente en el descubrimiento de nuevas drogas para su

tratamiento. Desde 1974, solamente en el Instituto Central de Experimentación Animal (CIEA) en Kawasaki, Japón, se han establecido y mantenido más de 450 líneas de tumores humanos en ratones "nude" (6). Asimismo se desarrollaron sistemas de monitoreo de drogas en alrededor de 90 líneas tumorales provenientes de diferentes tejidos tales como estómago, colon, recto, páncreas, pulmón, tejido nervioso y tejido hematopoyético. En consecuencia en los últimos años ha habido una gran demanda en la adquisición de conocimiento sobre este tema.

La cepa "nude" llegó a nuestro Bioterio en el año 1995 proveniente del Instituto Nacional de Salud (NHI) Maryland, EEUU (10). La producción de estos animales debe ir acompañada de un estricto control microbiológico. Por su condición de inmunodeficientes es imposible determinar la presencia de anticuerpos de origen infeccioso aplicando métodos serológicos convencionales, por lo que debe recurrirse a otras metodologías. La utilización de animales inmunocompetentes denominados **centinelas** es una herramienta importante para realizar estos controles.

Este reactivo biológico con el que cuenta la comunidad científica argentina, es comparable a aquellos que están disponibles en los países desarrollados, ya que el Bioterio sigue una reglamentación internacional del uso de animales de laboratorio (3). De esta manera se cuenta con un reactivo biológico estandarizado.

### **Instalaciones:**

El Bioterio de la FCV-UNLP cuenta con un área de producción de animales SPF, la cual se subdivide en una zona limpia y una zona de preparación de materiales. La primera está compuesta por 4 salas de disposición central, destinadas al alojamiento de los animales, un depósito de insumos estériles, un pasillo limpio de ingreso a las salas, uno de retorno para salir de las mismas y un sector de vestuario y duchas para el ingreso del personal. (Figura 1)

La zona de preparación de materiales está constituida por una sala de lavado y autoclavado y depósitos anexos, y se encuentra separada del área limpia por barreras sanitarias.

Estas barreras sanitarias que separan ambos sectores combinan aspectos constructivos, de equipamiento, que sumado a los procedimientos operativos evitan el ingreso de microorganismos indeseables al sector limpio.

De las 4 salas dos se destinan a la producción de los animales "nude". Los factores macroambientales se manejan de la siguiente forma:

- ***Ventilación por presurización:*** el aire es tomado desde el exterior en donde atraviesa una malla tamiz, un prefiltro High Flow y prefiltro multibolsa para finalmente ingresar sobre

el techo y en el medio de la sala atravesando un filtro HEPA (high efficiency particulate air) absoluto final con una eficacia de filtración de 99.99% (11). Luego el aire es expulsado a través de tomas de extracción de aire en los cuatro extremos inferiores de la sala. De esta manera al regular el ingreso y egreso de aire de la sala se logra una presión positiva, que establece una circulación unidireccional del flujo de aire, y permite realizar entre 15 y 20 recambios totales de aire por hora, manteniendo niveles mínimos de gases y olores nocivos producidos por las excretas de los animales. Cada sala posee un manómetro que verifica la presión positiva.

- **Temperatura:** se mantiene en un rango de 24 +/- 2 °C a lo largo de todo el año y se registra en forma permanente a través de un termógrafo.
- **Iluminación:** con tubos fluorescentes tipo luz de día, con un ciclo de 13 horas luz, y 11 horas oscuridad, el cual se regula con un reloj temporizador.
- **Disposición de cajas:** La sala presenta una superficie de 240 m<sup>3</sup>, en donde se disponen, estanterías móviles (de acero inoxidable) para alojar las cajas de los animales. Se encuentra también una mesa móvil en donde se realiza la mayor parte del trabajo dentro en la sala. Los animales se alojan en cajas de acero inoxidable de 30 x 20 x 14 cm, con una tapa reja compuesta por un comedero tipo tolva y un bebedero para colocar botellas con pico. Como lecho se utiliza viruta estéril de pino que es renovado cada semana con una nueva caja esterilizada.

### **Preparación de Insumos:**

En el sector de preparación de insumos y lavado se recibe el material sucio y se lo prepara para el posterior ingreso al área limpia. En dicho sector se encuentra como barrera sanitaria de ingreso de insumos un autoclave doble puerta que trabaja a 121°C con diferentes tiempos de esterilización, una trampa germicida con una solución de hipoclorito de sodio concentrado y una doble puerta germicida con tubos de luz ultravioleta (UV).

- **Agua:** se utilizan botellas de vidrio con tapa que luego de llenarse con agua corriente se colocan dentro de cajas de acero inoxidable para ser esterilizadas en ciclos de 22 minutos. En la zona limpia se almacenan en las estanterías correspondientes para luego ser utilizadas en las salas.
- **Lecho:** la viruta que llega al establecimiento sufre una doble esterilización antes de ser utilizada. La primera se realiza en bolsas de papel con la viruta tamizada, luego ésta se

coloca en las cajas de los animales para realizar el segundo esterilizado. El ciclo de autoclavado es de 25 minutos y 40 de tiempo de secado.

- **Alimento:** se autoclava previamente tamizado en un ciclo de 18 minutos de esterilizado y 26 de secado.
- **Indumentaria del personal:** se autoclava empaquetada y rotulada utilizando el mismo ciclo que el lecho
- **Insumos no autoclavables:** Los insumos que no resisten la temperatura de esterilización, como los guantes de goma, botas de trabajo y demás materiales ingresan a través de la trampa germicida o por pulverización con desinfectante y posterior exposición a la radiación UV de la doble puerta.

### **Ingreso del Personal:**

El personal que ingresa al establecimiento debe cambiarse el calzado. En la zona de preparación de materiales se usa indumentaria completa de un color determinado. Para ingresar a la zona limpia previa ducha, es necesario vestirse con ropa estéril (gorro, máscara, mameluco, medias, botas y guantes) (5).

### **Manejo operativo dentro de las salas:**

El personal responsable de la sala es quien está a cargo del mantenimiento y cuidado de los animales que allí se encuentran. Debe seguir un protocolo de actividades semanales en las que se incluye el cambio de cajas con lecho estéril, suministro de agua y alimento, limpieza y desinfección de las estanterías y sala en general, control de manómetro y termógrafo, manejo reproductivo de la colonia, registros de nacimientos, destetes y de stock de animales (5)(8).

Al ingresar a la sala debe desinfectar sus botas en pediluvio y sus manos por medio de un rociador con desinfectante. Al finalizar el trabajo en la sala, el personal debe limpiar y desinfectar el piso, y una vez por semana el techo y paredes.

Para el cambio de animales a una nueva caja se utilizan pinzas estériles para sujeción inmersas en solución desinfectante. Se usan paños con solución desinfectante para la limpieza de las estanterías y mesa de trabajo.

Todo material, insumo o animal que caiga al piso debe ser retirado de la sala.

Se utilizan como solución desinfectante hipoclorito de sodio al 5 % en agua para piso, paredes, techo y pediluvio, y un amonio cuaternario para la mesa móvil, estanterías, rociador, pinzas y paños.

Todo el manejo operativo dentro de la sala se encuentra protocolizado y asentado en planillas siguiendo una serie de pautas.

### **Métodos de Validación de Barreras Sanitarias:**

Para verificar el proceso de esterilización durante los ciclos de autoclavado se colocan cintas reactivas que viran de color a 121°C, indicadores químicos, y microorganismos termófilos en cápsula cerrada. Periódicamente, a través de un programa preestablecido, se realizan controles microbiológicos de los ratones, del ambiente de todo el bioterio, y del agua y alimento (11)(9); como así también la validación técnica de los equipos y sistemas.

### **RESULTADOS**

Desde el año 1995 se han producido en nuestra unidad más de 8000 ratones N:NIH(S)-*nu*, que se entregaron a diferentes entidades nacionales e internacionales como por ejemplo: Fundación Leloir, Fundación de investigación del cáncer (FUNDIC), Fundación SALES, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET), Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental (ICBME) Hospital Italiano, Instituto de Higiene Facultad de Ciencias Médicas Universidad de la República Montevideo Uruguay, Instituto de Inmunoncología “Dr. Ernesto Crescenti”, Comisión Nacional de Energía Atómica Departamento de Radiobiología CNEA, entre otros.

### **CONCLUSIÓN**

Los controles microbiológicos demostraron que los animales conservan su condición de SPF, por lo cual las técnicas de manejo aplicadas, los procedimientos y el sistema de barreras sanitarias se comportan eficientemente. Asimismo el constante entrenamiento y capacitación del personal ha sido de vital importancia para lograr los objetivos de producción.

Siguiendo esta línea se prevé el ingreso al bioterio de otras cepas inmunodeficientes, que al igual que la cepa N:NIH(S)-*nu* contribuirán con el desarrollo de las investigaciones en salud humana en Argentina.

### **REFERENCIAS**

1. CAGLIADA P., MASCHI F., AYALA M., CARRIQUIRIBORDE M., LABORDE J., PRINCIPI G., CARBONE C. “*El Ratón Nude N:NIH(S)-nu como Herramienta Fundamental para Investigaciones en Inmunología y en Tumores Transplantables*”

- Humanos**". Boletín de la Asociación Argentina de Experimentación con Animales de Laboratorio. Buenos Aires: Boletín N° 16. Diciembre 2001. Pág. 7-10.
2. FOGH Jorgen y BEPPINO C "*The Nude Mice in Experimental and Clinical Research.*" Giovanella: Academic Press, 1978.
  3. FUJIKURA, HOVELL, HÄNNINEN y PELKONEN "*Guidelines for Breeding and Care of Laboratory Animals*". Geneva: WHO y ICLAS, 1993
  4. OLFERT Ernest D., CROSS Brenda M., MC WILLIAM A. Ann. "*Manual sobre el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación Vol. 1. 2<sup>da</sup> Edición.*" Ottawa: Consejo Canadiense de Protección de los Animales, 1998.
  5. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. "*Animales de Laboratorio. Manual para Técnicos. Organización Panamericana de la Salud Publicación Especial N°1*" Ramos Mejia: Centro Panamericano de Zoonosis, 1974.
  6. RYGAARD, Jorgen y POVLSEN Carl O. "*Athymic (nude) Mice.*" en "The Mouse on Biomedical Research Vol. IV" FOSTER HL. New York: Academic Press, 1982.
  7. STARK, D. M. y OSTROW M. E. "*Training Manual Series. Vol. II.*" Cordova: American Association for Laboratory Animal Science, 1990.
  8. VAN ZUTPHEN y BALLS "*Animals Alternatives, Welfare and Ethics.*" Ámsterdam: Elsevier, 1997.
  9. VAN ZUTPHEN, BAUMANS Y BEYNEN "*Principios de la Ciencia del Animal de Laboratorio.*" Armilla: Secal, 1999.
  10. WATSON, William. HANSEN, Carl. POTKAY, Stephen. WHITNEY, Robert. "*Catalogue NIH Rodents*" Maryland EEUU: NIH Publication, 1982.
  11. ZÚÑIGA Jesus.M.; TUR MARÍ José.; MILOCCO Silvana N.; PIÑEIRO Ramón. "*Ciencia y Tecnología en Protección y Experimentación Animal.*" Madrid: McGraw Hill Interamericana, 2001.

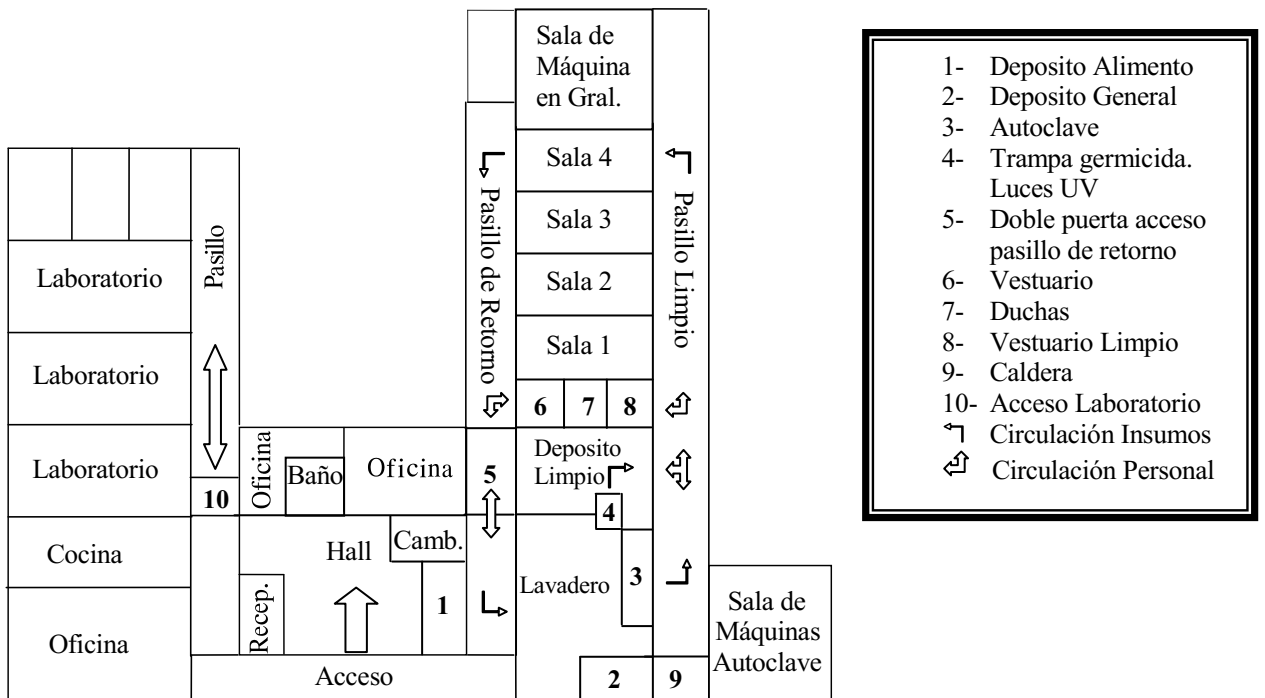


Figura 1- **Esquema Cátedra de Animales de Laboratorio y Bioterio (FCV-UNLP)**