

## 1. REGULACIÓN

A nivel español existen una serie de leyes que regulan el empleo de los animales de experimentación:

- Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio

En esta ley los objetivos principales son: que los animales de experimentación en su transporte no sufran sufrimiento ni dolor innecesarios, por lo que tanto el medio de transporte como los centros deberán tener en consideración esto para no causar sufrimiento animal. Además, las personas que los manipulen deberán estar correctamente formados y capacitados. Consecuentemente, existirán inspecciones periódicas de los centros y medios de transportes y la creación de sanciones cuando no se cumpla lo establecido en esta ley.

- Ley 6/2013, de 11 de junio, de modificación de la Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio.

En este caso, los centros los cuales suministran crían y emplean los animales para fines científicos, incluido la docencia, deberán estar autorizados y evaluados por la normativa de la Unión Europea. Además, se añade que todas las modificaciones que se hagan en el proyecto previamente aprobado tendrán que ser aprobadas por el comité ético científico que evaluó el proyecto.

-

Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

En este caso la creación de la presente decreto ha sido la reducción de los animales de experimentación, que se evite el sufrimiento animal, por lo que los animales deben tener todos los cuidados necesarios ni se empleen más especímenes de los estrictamente necesarios para el proyecto. También se aumenta los requisitos tanto para los centros criadores como para los centros de investigador que los emplean, poniendo apartados específicos para el cuidado de los animales según la especie empleada y junto los procedimientos de anestesia según la especie. Además, se crea un tipo de solicitud normalizada para los proyectos que necesiten empleo de animales, los cuales deben cumplir una serie de requisitos

- Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

En esta ley, se detallan al por menor los requisitos que deben tener las personas que trabajan con animales de experimentación, siendo indispensable para que puedan emplearlos. Para poder manipular animales de experimentación debes tener una titulación universitaria y superar cursos de formación teórico-práctica, los cuales los trabajadores deben realizar de forma periódica. Según el tipo de animal que se emplee, existen distintos cursos.

## 2. PROYECTO Y PROCEDIMIENTO

### EMPLEO DEL RATÓN COMO MODELO ANIMAL EN EL ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES DEL SUEÑO EN EL TRASTORNO DE ESTRÉS POSTRAUMÁTICO

El trastorno de estrés posttraumático (TEPT) es una enfermedad dentro del ámbito psiquiátrico que presenta una gran prevalencia en la sociedad de los seres humanos. Se produce mayoritariamente a raíz de alguna vivencia perturbadora o traumática para el individuo, como puede ser la participación en situaciones de carácter bélico o la muerte de un ser querido o familiar cercano (como los progenitores).

Una de las consecuencias más relevantes del TEPT es la alteración de la calidad del sueño, teniendo implicaciones trascendentales en el desarrollo de actividades y longevidad de las personas que lo padecen<sup>3,4,5</sup>. Hoy en día, es una enfermedad en la que no se trata al paciente de forma adecuada en la mayoría de los casos, por lo que se está invirtiendo en su comprensión. Como es una enfermedad en la que están implicados distintos factores, como los neuroendocrinos, genéticos y ambientales, necesitamos del empleo de animales de experimentación para incrementar el conocimiento sobre el TEPT y sus posibles tratamientos. En este caso, se emplea en la investigación biomédica modelos murinos debido a que son animales sociales como las personas, por lo que presentan comportamientos similares a los de los seres humanos, su dotación genética es similar (permitiendo así la búsqueda de genes y dianas terapéuticas para su tratamiento), son sencillos de obtener y presentan un mantenimiento bajo económicamente, permitiendo la maximización de obtención de resultados invirtiendo la menor cantidad temporal y monetaria<sup>2,4,5</sup>.

Debido a la complejidad que implica el estudio del TEPT y la versatilidad del modelo murino, se pueden diseñar distintos experimentos para inducir dicho trastorno. Los que se emplean mayoritariamente son los siguientes<sup>1,4,5</sup> :

- Empleo de descargas eléctricas en las extremidades

Las descargas son de 1,5mA durante un período de 2 segundos en intervalos de 6h. Para realizarlas se emplean jaulas con el suelo electrificado. Provoca altos niveles de estrés que produce alteraciones de los ciclos circadianos.

- Uso de orines de potenciales depredadores como *Felis silvestris catus* (gato doméstico).

Provoca altos niveles de miedo junto con estrés intensos en los ratones, seguidos de respuestas conductuales, endocrinas y alteraciones de los ciclos circadianos. Para su empleo se rocía mediante difusores hormonas sintéticas de los orines de gatos en el suelo de la jaula, principalmente cerca de las zonas de descanso y alimentación.

- Suspensión de la cola durante un corto período de tiempo

Se realiza repetidas veces durante el día, alrededor 10 veces diarias. Normalmente no excediendo más de 5 minutos. Son los propios investigadores que cogen por la punta de la cola del animal.

- Separación temprana de las crías de la figura materna.

Provoca altos niveles de miedo junto con estrés intensos en los ratones, seguidos de respuestas conductuales, endocrinas y alteraciones de los ciclos circadianos. Se realiza la separación pocos minutos después de su nacimiento la separación de las madres y crías. En este caso es a través de cajas negras la alimentación de las crías para que no vean a los técnicos o investigadores que los alimenten. Las crías entre sí también se separan. Este ensayo tiene una duración aproximada de 5 y 7 semanas, cuando el ratón ya es adulto.

- Privación del sueño alterando los ciclos de vigilia de los animales.

Provoca altos niveles de estrés en los animales, alteraciones conductuales, neuroendocrinas y circadianas. Se emplean bombillas para simular en ciclo de luz y no se apagan durante 10

días.

En todos los casos anteriores los animales estarán en jaulas sin sobrepasar los 4 individuos por jaula, se estudiará el sueño de los animales en salas de registro de sueño. La temperatura ambiente será de 25°C, los ciclos de luz y oscuridad serán 12h:12h y tendrán agua y alimento en total disponibilidad. Una vez finalizado los experimentos se han eutanasiado a los animales previamente anestesiados. A continuación se les extrae el cerebro para poder hacer análisis moleculares a nivel neuronal.

Los experimentos anteriores han permitido determinar las 2 principales dianas terapéuticas. Dichos blancos moleculares son la proteína de unión a FK506 51 (siendo FK506 51 una inmunofilina asociada al receptor de progesterona de 51 kDa) junto con el adenosreceptor  $\alpha 2c$ . En el primero caso se ha visto que la variación alélica del gen junto con las modificaciones epigenéticas que puede sufrir, pueden favorecer al padecimiento de este tipo de enfermedades psiquiátricas. La función de la proteína de unión de FK506 51 (también conocida como FKBP5) es la alteración del eje hipotalámico-pituitario-adrenal debida a la regulación por retroalimentación negativa frente al cortisol ya que se activa a los receptores de glucocorticoides que al mismo tiempo que se favorece a la síntesis de más FKBP5. Por lo tanto, una inhibición farmacológica de esta diana supondrá una mejora en el TEPT. En el segundo caso, se ha observado que los adenosreceptores  $\alpha 2c$  tienen una actividad importante en el sistema nervioso central ya que están involucrados en un ciclo de retroalimentación negativa frente al control de la noradrenalina.

Por consiguiente, el empleo de este tipo de metodologías en ratones se ha conseguido identificar antagonistas para ambas dianas terapéuticas como el tacrolimus y el prazosin supondrían un futuro prometedor para el tratamiento do TEPT y, por tanto, una mejora sustancial en la calidad de sueño de los individuos.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Aykac, A., Şehirli, A. Z., & Gören, M. Z. (2020). Evaluation of the Effect of Prazosin Treatment on  $\alpha$ -2c Adrenoceptor and Apoptosis Protein Levels in the Predator Scent-Induced Rat Model of Post- Traumatic Stress Disorder. *Journal of Molecular Neuroscience*, 70(7), 1120–1129. <https://doi.org/10.1007/s12031-020-01518-7>
2. Fenster, R. J., Lebois, L. A. M., Ressler, K. J., & Suh, J. (2018). Brain circuit dysfunction in post- traumatic stress disorder: from mouse to man. *Nature Reviews Neuroscience*, 19(9), 535–551. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0039-7>
3. Philbert, J., Pichat, P., Beeské, S., Decobert, M., Belzung, C., & Griebel, G. (2011). Acute inescapable stress exposure induces long-term sleep disturbances and avoidance behavior: A mouse model of post-traumatic stress disorder (PTSD). *Behavioural Brain Research*, 221(1), 149– 154. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.02.039>
4. Schöner, J., Heinz, A., Endres, M., Gertz, K., & Kronenberg, G. (2017). Post-traumatic stress disorder and beyond: an overview of rodent stress models. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 21(10), 2248–2256. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13161>
5. Sharma, R., Sahota, P., & Thakkar, M. M. (2018). Severe and protracted sleep disruptions in mouse model of post-traumatic stress disorder. *Sleep*, 41(3), 1-12. <https://doi.org/10.1093/sleep/zsy003>
6. Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación,

transporte, experimentación y sacrificio, Ley n.º 32/2007 (2007, 8 de noviembre) (España). Boletín Oficial del Estado, (268). <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2007-19321>

7. Ley 6/2013, de 11 de junio, de modificación de la Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio, Ley n.º 6/2013 (2013, 12 de junio) (España). Boletín Oficial del Estado, (140). <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2013-6271>

8. Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, Orden n.º ECC/566/2015 (2015, 1 de abril) (España). Boletín Oficial del Estado, (78). <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2015-3564>

9. Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, Real Decreto n.º 53/2013 (2013, 8 de febrero) (España). Boletín Oficial del Estado, (34). <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2013-1337>

Apr  b