

Nuevos modelos animales: acercándose al ser humano

C. GOICOECHEA GARCÍA, E.M. SÁNCHEZ ROBLES Y R. ABALO DELGADO

RESUMEN

Los primeros estudios sobre dolor con animales de experimentación iban dirigidos al estudio de reflejos asociados a estímulos dolorosos agudos, pero ese tipo de experimentos, válidos para la evaluación de fármacos analgésicos, no imitaba lo que ocurría en la clínica, en situaciones de dolor crónico. Por ello se fueron desarrollando nuevos modelos, cada vez más enfocados a situaciones de dolor crónico. Sin embargo, en estos modelos frecuentemente se sigue valorando únicamente la aparición de conductas reflejas, poco relacionadas con la realidad clínica. En la actualidad, en la investigación básica se busca aproximarse cada vez más a la situación real del paciente con dolor crónico, a la valoración no solo de umbrales de respuesta al estímulo, sino también de conductas operantes, de procesos de adaptación y de indicadores de calidad de vida. En esta revisión se repasan los últimos avances producidos en esta nueva estrategia de estudio y tratamiento del dolor en la experimentación animal.

Palabras clave: Analgesia. Modelos animales. Conducta. Dolor. Actividad espontánea. Motivación.

ABSTRACT

Classically, animal pain models were focused to evaluate nociceptive reflexes, produced in animal in response to a noxious stimulus. However, this approach did not adequately replicate realistic clinical situations. New chronic pain models were created, but the evaluation of direct reflexes remained the principal pain measure. Actually, experimental pain research proposes a new approach: to evaluate operant and innate behaviors instead of pure reflexes and to analyze organized responses and indexes of "quality of life" in those animals under chronic pain. In this article some of these new techniques will be reviewed. (DOLOR. 2016;31:77-81)

Corresponding author: Carlos Goicoechea, carlos.goicoechea@urjc.es

Key words: Analgesia. Animal model. Behavioral outcomes. Pain. Spontaneous and motivated behavior.

Área de Farmacología y Nutrición, Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Rey Juan Carlos; Unidad Asociada al Instituto de Química Médica (IQM) y al Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) del CSIC; Grupo de Excelencia Investigadora URJC-Banco de Santander-Grupo Multidisciplinar de Investigación y Tratamiento del Dolor (i+DOL).

Dirección para correspondencia:

Carlos Goicoechea
Farmacología y Nutrición
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad Rey Juan Carlos
Avda. Atenas, s/n
28922 Alcorcón, Madrid
E-mail: carlos.goicoechea@urjc.es

INTRODUCCIÓN

Cuando el paciente acude a la Unidad del Dolor, el médico no le quema la espalda para comprobar si lo que dice es cierto, que efectivamente le duele la zona lumbar, ni le aprieta la rodilla hasta que el paciente no puede más y la retira de forma brusca. Generalmente, el médico pide al paciente que valore su dolor en una escala numérica, que describa el tipo de dolor y sus características, que le comente cómo se encuentra en general, su estado de ánimo, y, como mucho, emplea algún sistema de valoración de la respuesta nociceptiva (algómetro, filamento de Von Frey...).

Cuando se valora el «dolor» en un animal de laboratorio, lamentablemente no siempre se pueden emplear los mismos recursos que en la consulta, y no es infrecuente que la manera más habitual de valorar la respuesta al «dolor» sea provocando más «dolor» al animal. La palabra *dolor* no va entrecorrida por casualidad; hablar de «dolor» cuando se trata de animales es complicado. Se sabe qué es la nocicepción, sabemos cómo provocar un estímulo nociceptivo en un animal de laboratorio y cómo valorar su respuesta: podemos calibrarla, numerarla y graduarla..., pero no sabemos qué es el dolor en un animal. No sabemos reconocer el dolor espontáneo, ni cómo se «siente» un animal, ni las emociones que ese estímulo le provoca. Y lógicamente este hecho aleja la «verdad experimental» del animal de laboratorio de la realidad del paciente con dolor crónico.

Por eso, en los últimos 10 años, los esfuerzos de los investigadores «básicos» se dirigen a desarrollar sistemas para la valoración del «dolor» sin tener que interaccionar directamente con el animal, para estudiar lo que llamaríamos el «dolor espontáneo» y la «calidad de vida» de los animales, y poder analizar el estado del animal de forma similar a como lo hace un clínico en la consulta. La hipótesis de trabajo es que cualquier cambio de conducta mantenido que se produzca a raíz de un modelo de dolor crónico puede ser una manifestación de ese dolor.

EXPRESIÓN NO VERBAL DEL DOLOR CRÓNICO

Para poder valorar el dolor espontáneo en animales, la estrategia ha partido, como debe ser en la

investigación traslacional y en el método científico en general, de la observación de lo que ocurre en los humanos, fijándose en aquellos que, como los animales de laboratorio, no pueden comunicar: los niños. Existen desde hace tiempo escalas de reconocimiento facial del dolor, tanto en niños pequeños¹ como en neonatos². Hace cinco años, un grupo de la Universidad McGill, en Canadá, presentó la primera escala de reconocimiento facial en animales³. Este grupo grabó en vídeo a varias decenas de ratones tras administrarles ácido acético intraperitoneal o formalina subcutánea para tratar de establecer unos patrones de respuesta al dolor. Valorando la posición de las orejas, del hocico, o la apertura de los ojos, elaboraron una escala que denominaron escala de muecas del ratón (*mouse grimace scale* [MGS]). Propusieron que la MGS permite valorar el nivel afectivo del dolor basándose en el hecho de que la lesión de la ínsula (fuertemente implicada en el componente emocional del dolor en humanos) bloqueaba los cambios faciales manteniéndose intacta la respuesta en el test de las contorsiones. Posteriormente se ha presentado esta escala para ratas⁴ y conejos⁵, y no solo en dolor inflamatorio, sino también en dolor postoperatorio (ovariectomía, vasectomía)^{6,7}. En cualquier caso, se necesitan más trabajos para confirmar la utilidad de esta escala y su relación con la respuesta a un posible dolor espontáneo.

ALTERACIONES FUNCIONALES ASOCIADAS AL DOLOR CRÓNICO

Otra propuesta para valorar el dolor espontáneo es fijarse en los cambios posturales de los animales en situaciones de dolor mantenido. Es de esperar que un animal, al igual que ocurre con un paciente, adopte una conducta antiálgica en situación de dolor, protegiendo la zona o evitando moverla (o emplearla si es una articulación). Para valorar estas conductas existen ya bastantes aproximaciones: una consiste en dejar al animal en una jaula de espacio reducido y valorar el peso que ejerce en cada pata. En situación basal el reparto en las cuatro patas es homogéneo. Si tiene alguna pata lesionada, el animal aumenta el peso sobre la pata no lesionada, y se puede así valorar el grado de «malestar» del animal, sin necesidad de aplicar ningún estímulo nocivo en esa pata⁸. Un sistema más sofisticado es el denominado *cat walk test*⁹: el animal camina por una superficie estable plana y un *software* determina, mediante un análisis de la pisada, la intensidad de

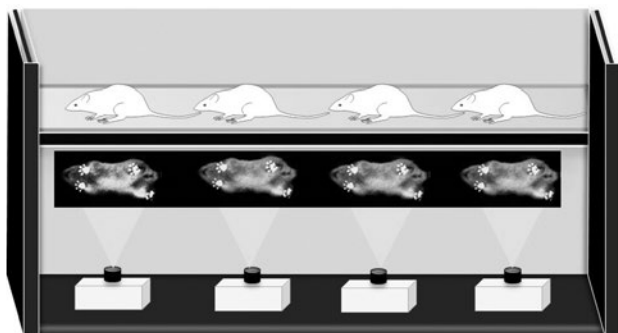


Figura 1. El *cat walk test* analiza la marcha del animal valorando la función y la coordinación motora.



Figura 2. El test de fuerza de agarre, o *grip strength test*, mide la fuerza requerida para que el ratón o rata se suelte de la rejilla.

la huella (Fig. 1). Aunque este sistema es eficaz en modelos de dolor inflamatorio y artrosis, tanto para valorar el dolor como la respuesta a fármacos analgésicos, en modelos de dolor neuropático su validez es discutible¹⁰.

Más recientemente, también para valorar las conductas defensivas, se ha desarrollado el test de la fuerza de agarre, o *grip strength test* (Fig. 2). Básicamente se valora la fuerza con la que se agarra un ratón en respuesta a una tracción suave de la cola¹¹. Evidentemente en esa respuesta pueden interferir muchas variables, además del dolor musculoesquelético, pero cabe pensar, de forma similar a lo que sucede en el humano, que la memoria del dolor, o dolor por anticipación, puede afectar igualmente a la respuesta.



Figura 3. La rueda de actividad mide el bienestar del animal valorando la cantidad de tiempo que este pasa en ella o la distancia que recorre.

ALTERACIONES DE CONDUCTAS OPERANTES ASOCIADAS AL DOLOR CRÓNICO

Valoración de la calidad de vida

Otro abordaje bastante reciente, con implicaciones muy interesantes, consiste en buscar medios para valorar el bienestar del animal en situaciones basales y compararlo con las conductas en modelos de dolor crónico. Existen numerosos sistemas empleados clásicamente por los etólogos para valorar comportamientos innatos que ahora pueden aprovecharse para valorar la «calidad de vida» de los roedores.

Uno de estos modelos se basa en el uso que hacen los roedores de la rueda de actividad, como la que se coloca en las jaulas de los hámsteres caseros para que «jueguen» (Fig. 3)¹². Sus autores han demostrado que un animal sometido a un modelo de dolor crónico emplea menos la rueda y recorre menos metros, lo que se interpreta como un aumento del malestar en general, es decir, no solo se trata de una disfunción motora, sino también de una disminución del «estado anímico» del ratón. La administración de fármacos antiinflamatorios provoca un aumento de la actividad, incluso a dosis más bajas de las necesarias para producir un efecto analgésico en respuesta a un estímulo nocivo.

Al igual que en el caso de la rueda, se sabe que los roedores ejecutan ciertas actividades más por «placer» que por necesidad, como por ejemplo las de enterramiento: se ha comprobado que esta actividad innata disminuye en situaciones de dolor inflamatorio, neuropático o posquirúrgico^{13,14}, y se recupera tras la administración de fármacos analgésicos.

Valoración de la motivación y el «estado de ánimo»

Para valorar aspectos relacionados con la motivación (o con la emoción, si es que este término puede aplicarse a los animales de laboratorio) se ha comenzado a emplear el test de preferencia de plaza, un modelo empleado habitualmente para valorar conductas reforzadoras o incluso adictivas en respuesta a tratamientos, farmacológicos o no. El paradigma consiste en tres habitáculos de características muy diferentes: uno neutro y otros dos que pueden ser fácilmente identificados por el animal (paredes de colores distintos, suelo liso frente a rugoso, olores diferentes, etc.) (Fig. 4). Así, el animal puede asociar fácilmente la administración de una sustancia con el habitáculo en que se produce. Los animales con dolor neuropático tratados con un fármaco analgésico pasan más tiempo en la habitación donde han recibido ese tratamiento¹⁵. Se han obtenido resultados similares con otros tipos de dolor experimental como la artrosis¹⁶.

Otros paradigmas que también pueden emplearse para asociar el dolor con el estado de ánimo son el campo abierto y el laberinto en cruz. Se trata de tests que provocan ansiedad en el ratón y que clásicamente se han empleado para valorar los fármacos ansiolíticos. La justificación para su uso reposa en que, en condiciones de dolor crónico, y de forma similar a lo que puede ocurrir en seres humanos, el animal podría mostrar un elevado nivel de ansiedad. Aunque por el momento no se ha demostrado en todos los casos que el dolor crónico aumente las conductas de ansiedad, se ha comprobado que los fármacos analgésicos disminuyen esas conductas cuando son provocadas experimentalmente¹⁷.

Un sistema que puede emplearse para valorar de forma indirecta la respuesta al dolor se basa en estudiar las conductas de autoadministración de fármacos en el animal. Se ha comprobado que los animales con dolor inflamatorio ingieren preferentemente una solución que contiene analgésico (antiinflamatorios no esteroideos o morfina) en lugar de agua azucarada (que suelen preferir). Sin embargo, si el dolor es de tipo neuropático, el incremento en el consumo de opioide no es significativo^{18,19}. Existen también protocolos de autoadministración que enseñan al animal



Figura 4. El test de preferencia de lugar, o *place preference*, valora la motivación del animal teniendo en cuenta el tiempo que permanece en cada habitáculo.

a obtener una dosis de analgésico pulsando una palanca o activando algún sistema parecido. En esos casos, el animal suele recibir una dosis de fármaco por vía sistémica o central, y se puede valorar de forma indirecta tanto la existencia o no de dolor como la capacidad analgésica del fármaco autoadministrado²⁰.

ÚLTIMOS AVANCES: EL CAMPO DE LA OPTOGENÉTICA

En los últimos cinco años ha surgido una nueva tecnología que puede revolucionar el mundo de la investigación básica en dolor, la optogenética. Básicamente este abordaje consiste en poder activar y desactivar un sistema cualquiera, a distancia, empleando como factor desencadenante un haz de luz²¹. Mediante manipulación genética se introduce en una célula un sistema receptor de luz, un receptor ionotrópico de rodopsina, que, al ser iluminado, permite la activación celular. Una de las aplicaciones más elegantes dirigidas al estudio del dolor permite activar específicamente las vías del dolor, sin necesidad de someter al animal a ningún tipo de manipulación directa ni estímulo nocivo²². De forma resumida, la técnica consiste en crear un ratón transgénico cuyo sistema nociceptivo pueda activarse mediante la luz. Para ello, se emplea material genético de células embrionarias, para insertar el receptor de rodopsina en un nociceptor que exprese el canal de sodio Nav1.8. Cuando este ratón se desarrolla, todos los nociceptores que expresan el receptor Nav1.8 incorporan en sus membranas a este receptor sensible a la luz. Al aplicar una fuente de luz en la superficie de la pata

de este ratón, se activan los nociceptores, de forma que se genera un estímulo nociceptivo, que puede «encenderse» y «apagarse» a voluntad. Se trata, pues, de una técnica que permite, de forma selectiva y específica, activar únicamente el tipo de neurona que presenta el receptor de rodopsina. De esta forma, entre otras aplicaciones, se ha conseguido un modelo de dolor espontáneo, que puede aparecer y desaparecer a voluntad del investigador.

Con un abordaje similar, en células del sistema nervioso central se ha conseguido recientemente demostrar el papel jugado por el sistema corticoestriatal en la modulación del dolor neuropático²³.

CONCLUSIÓN

La búsqueda de modelos animales cada vez más próximos a las enfermedades humanas ha experimentado un considerable avance en los últimos años. Es cierto que la observación de conductas operantes, más allá de los reflejos directamente relacionados con el estímulo nocivo, puede provocar dudas sobre la selectividad de la respuesta, pero no lo es menos que en la realidad clínica el dolor crónico es una suma de factores, reflejos y emociones, que van más allá de la siempre respuesta a la activación de un nociceptor. Cuanto más capaces seamos, desde la investigación básica, de reflejar ese «escenario» en los animales de laboratorio, más próximos estaremos de poder ofrecer alternativas terapéuticas reales y selectivas para el abordaje del dolor crónico.

BIBLIOGRAFÍA

- McGrath PA, Seifert CE, Speechley KN, Booth JC, Stitt L, Gibson MC. A new analogue scale for assessing children's pain: an initial validation study. *Pain*. 1996;64(3):435-43.
- Holsti L, Grunau RE. Initial validation of the Behavioral Indicators of Infant Pain (BIIP). *Pain*. 2007;132(3):264-72.
- Langford DJ, Bailey AL, Chanda ML, et al. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat Methods*. 2010;7(6):447-9.
- Sotocinal SG, Sorge RE, Zaloum A, et al. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol Pain*. 2011;7:55.
- Keating SC, Thomas AA, Flecknell PA, Leach MC. Evaluation of EMLA Cream for Preventing Pain during Tattooing of Rabbits: Changes in Physiological, Behavioural and Facial Expression Responses. *PLoS ONE*. 2012;7(9):e44437.
- Matsumiya LC, Sorge RE, Sotocinal SG, et al. Using the Mouse Grimace Scale to reevaluate the efficacy of postoperative analgesics in laboratory mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2012;51(1):42-9.
- Leach MC, Klaus K, Miller AL, Scotto di Perrotolo M, Sotocinal SG, Flecknell PA. The assessment of post-vasectomy pain in mice using behaviour and the Mouse Grimace Scale. *PLoS One*. 2012;7(4):e35656.
- Vayssé L, Sol JC, Lazorthes Y, Courtade-Saidi M, Eaton MJ, Jozan S. GABAergic pathway in a rat model of chronic neuropathic pain: modulation after intrathecal transplantation of a human neuronal cell line. *Neurosci Res*. 2011;69(2):111-20.
- Vrinten DH, Hamers FF. 'CatWalk' automated quantitative gait analysis as a novel method to assess mechanical allodynia in the rat; a comparison with von Frey testing. *Pain*. 2003;102(1-2):203-9.
- Piesla MJ, Leventhal L, Strassle BW, et al. Abnormal gait, due to inflammation but not nerve injury, reflects enhanced nociception in preclinical pain models. *Brain Res*. 2009;1295:89-98.
- Chandran P, Pai M, Blomme EA, Hsieh GC, Decker MW, Honoré P. Pharmacological modulation of movement-evoked pain in a rat model of osteoarthritis. *Eur J Pharmacol*. 2009;613(1-3):39-45.
- Cobos EJ, Ghasemlou N, Araldi D, Segal D, Duong K, Woolf CJ. Inflammation-induced decrease in voluntary wheel running in mice: a nonreflexive test for evaluating inflammatory pain and analgesia. *Pain*. 2012;153(4):876-84.
- Andrews N, Legg E, Lisak D, et al. Spontaneous burrowing behaviour in the rat is reduced by peripheral nerve injury or inflammation associated pain. *Eur J Pain*. 2012;16(4):485-95.
- Jirkof P, Cesarovic N, Rettich A, Nicholls F, Seifert B, Arras M. Burrowing behavior as an indicator of post-laparotomy pain in mice. *Front Behav Neurosci*. 2010;4:165.
- King T, Vera-Portocarrero L, Gutierrez T, et al. Unmasking the tonic-aversive state in neuropathic pain. *Nat Neurosci*. 2009;12(11):1364-6.
- Liu P, Okun A, Ren J, et al. Ongoing pain in the MIA model of osteoarthritis. *Neurosci Lett*. 2011;493(3):72-5.
- Hasnie FS, Breuer J, Parker S, et al. Further characterization of a rat model of varicella zoster virus-associated pain: Relationship between mechanical hypersensitivity and anxiety-related behavior, and the influence of analgesic drugs. *Neuroscience*. 2007;144(4):1495-508.
- Colpaert FC, Tarayre JP, Alliaga M, Bruins Slot LA, Attal N, Koek W. Opiate self-administration as a measure of chronic nociceptive pain in arthritic rats. *Pain*. 2001;91(1-2):33-45.
- Kupers R, Gybels J. The consumption of fentanyl is increased in rats with nociceptive but not with neuropathic pain. *Pain*. 1995;60(2):137-41.
- Martin TJ, Kim SA, Buechler NL, Porreca F, Eisenach JC. Opioid self-administration in the nerve-injured rat: relevance of antiallodynic effects to drug consumption and effects of intrathecal analgesics. *Anesthesiology*. 2007;106(2):312-22.
- Carr FB, Zachariou V. Nociception and pain: lessons from optogenetics. *Front Behav Neurosci*. 2014;8:69.
- Daou I, Tuttle AH, Longo G, et al. Remote optogenetic activation and sensitization of pain pathways in freely moving mice. *J Neurosci*. 2013;33(18):631-40.
- Lee M, Manders TR, Eberle SE, et al. Activation of corticostriatal circuitry relieves chronic neuropathic pain. *J Neurosci*. 2015;35(13):5247-59.