

**PLIEGO DE PRESCRIPCIONES TÉCNICAS PARTICULARES QUE HAN DE REGIR EN EL CONTRATO DE SERVICIOS DE MICROSCOPIA ATÓMICA DE ALTA AFINIDAD EN VASOS CEREBRALES DE RATA NEONATA Y DE REALIZACIÓN DE EEG EN RATAS NEONATAS A ADJUDICAR POR PROCEDIMIENTO ABIERTO SIMPLIFICADO CON PLURALIDAD DE CRITERIOS FINANCIADO POR EL INSTITUTO DE SALUD CARLOS III COFINANCIADO POR LA UNIÓN EUROPEA.**

**PI23/00733**

**PAS 3-25**

**OBJETO DEL CONTRATO:**

El objeto es la contratación de un servicio externo de:

LOTE 1: Microscopía atómica de alta afinidad en vasos cerebrales de rata neonata

LOTE 2: Realización de EEG en ratas neonatas

**LOTE 1**

**DESCRIPCION TÉCNICA:**

El servicio consistirá en la detección y localización de la glicoproteína p presente en la superficie luminal de células endoteliales de vasos sanguíneos de cerebro neonatal de rata mediante microscopía de fuerza atómica de afinidad (A-AFM). Como molécula sensora se empleará un anticuerpo anti-glicoproteína p unido covalentemente al voladizo de AFM y se realizarán ensayos en muestras de vasos sanguíneos obtenidos de individuos controles (SHAM) y tratados con diferentes fármacos para el tratamiento de la hipoxia.

El estudio de distribución y densidad de Pgp transmembrana intraluminal en microvasos se realizará en cortes cerebrales de 5 µm de grosor en criostato, y tras identificar microvasos de al menos 10 µm de diámetro, seccionados longitudinalmente, se localizarán y cuantificarán los epítomos intraluminales de Pgp presentes en 3 zonas de 1 µm de longitud, mediante Microscopía de fuerza atómica de Afinidad (A-AFM). El barrido se realizará sobre al menos tres áreas diferentes de cada corte histológico con una superficie de cada una de ellas de entre 5-10 mm de lado. Los resultados se compararán con estudios de inmunohistoquímica con anticuerpos antiPgp marcados con Alexa F488, midiendo con microscopía confocal la fluorescencia media obtenida en tres microvasos con trayectos no ramificados de al menos 50 µm en vasos corticales de al menos 10 µm de diámetro, localizados en tres zonas distintas del cortex parietotemporal de ambos hemisferios.

Los estudios se harán en animales control (SHAM), modelo daño cerebral por hipoxia, tratamiento con tariquidar y, en estos dos últimos casos con tratamiento adicional de canbidiol y topiramato, en un total de 23 grupos..

El elemento esencial del proyecto es estudiar los cambios en la expresión y actividad de la glicoproteína p en función de la maduración y la influencia de la presencia de daño cerebral en el cerebro neonatal. Este estudio no puede hacerse sólo mediante estudios bioquímicos (Western blot) por la imposibilidad de diferenciar glicoproteína p inactiva de la activa.

### **Requisitos:**

El proveedor deberá garantizar el servicio del producto con los requisitos que establece los diferentes laboratorios de la fundación:

- Experiencia acreditada en el registro e interpretación de curvas fuerza-desplazamiento obtenidas mediante Microscopía de Fuerza Atómica de Afinidad (A-AFM).
- Experiencia demostrable en la utilización de A-AFM a tejidos orgánicos.
- Tasa de éxito demostrable (registros positivos/número total de registros) de, al menos, un 20%.
- Experiencia demostrable en la decoración de voladizos de microscopía de fuerza atómica con anticuerpos.

### **COMPROMISO DEL SERVICIO:**

El adjudicatario se compromete a:

1. Incluir la localización y distribución precisa de Pgp en microvasos, incluyendo la fabricación de las puntas funcionales, agentes entrecruzantes, anticuerpos y moléculas diana (Pgp).
2. Preparación de un informe que incluirá el protocolo experimental detallado con el que se hayan realizado los ensayos, así como los resultados obtenidos en relación con la identificación, densidad superficial y localización espacial de la glicoproteína p en las muestras de vaso sanguíneos analizadas, a la finalización del servicio,

Todo ello, en base a cumplir lo previsto por la normativa de prevención de riesgos laborales, de la Ley 31/1995, artículo 41, Obligaciones de los fabricantes, importadores y suministradores.

### **PLAZO DE EJECUCIÓN:**

El plazo de ejecución del contrato será de 3 años.

### **UBICACIÓN:**

La prestación se desarrollará en las instalaciones del prestador de servicios y se entregará en las instalaciones de la Fundación

### **LOTE 2**

El servicio consistirá en la realización del estudio de incidencia, intensidad y frecuencia de crisis epiléptica mediante EEG/EMG en ratas neonatas de un peso máximo aproximado de 60 gramos. Los estudios se harán en animales control (SHAM), modelo daño cerebral por hipoxia, tratamiento con tariquidar y, en estos dos últimos casos con tratamiento adicional de canbidiol y topiramato. Los grupos de estudio (sin tratamiento o con tratamiento simple o combinado) se realizarán aplicando los principios éticos de refinamiento, reducción y reemplazo. En todo caso se realizará un análisis a priori para estimar el tamaño muestral de los distintos grupos, considerando una significancia  $\alpha=0.05$ , un tamaño de efecto de 1-2-1.5 (tamaño de efecto =diferencia entre medias/desviación estándar) y una potencia superior al 60-80 %.

Los animales serán sometidos a cirugía estereotáctica para la implantación crónica de electrodos en el lado contralateral e ipsilateral a la lesión isquémica para registros de electroencefalografía intracraneal (iEEG). Los animales serán anestesiados con ketamina (80 mg/kg, i.p.) y xilazina (10 mg/kg, i.p.). Durante el procedimiento se evaluará la profundidad anestésica. cada 5 min. Antes de la cirugía, los animales serán tratados con una solución

oftálmica para prevenir la sequedad de los ojos. La temperatura rectal se mantendrá durante los procedimientos quirúrgicos mediante una almohadilla térmica a una temperatura corporal de  $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .

Los electrodos de registro iEEG se colocarán en corteza frontal y corteza parietal. Se colocará un electrodo de tierra en la corteza occipital. La confirmación de crisis convulsivas se determinará mediante el análisis de la señal de EMG mediante electrodos colocados en el músculo de la nuca. Los electrodos serán asegurados con pegamento quirúrgico y cubiertos con cemento dental. Para el manejo del dolor se administrará buprenorfina (Buprex, 0,05 mg/kg) por vía subcutánea antes y 8 h después de la cirugía. Las señales iEEG se adquirirán longitudinalmente en sesiones de 24-48 horas de duración. Los registros de iEEG se realizarán en ratas neonatas con libertad de movimiento en una jaula circular. Para recuperarse y habituarse, los animales serán trasladados a la sala de registro 1 semana antes del inicio de las sesiones de registro. El cabezal estará unido a un cable flexible y conectado a amplificadores AC tipo Grass, 78D o similar. La frecuencia de la línea eléctrica se eliminará utilizando un filtro "notch" a 50 Hz. Las señales se amplificaron  $8000 \times$  y serán filtradas por un paso de banda entre 0,3 y 100. Posteriormente las señales serán convertidas digitalmente a una frecuencia de muestreo de 500 Hz.

Un elemento clave del proyecto es demostrar que la administración de un inhibidor de la glicoproteína p aumenta la eficacia terapéutica de un anticonvulsivante (topiramato). Para ello es imprescindible realizar estudios de EEG, ya que las crisis convulsivas en ratas neonatas son muy poco sintomáticas. El registro de la actividad EEG durante 24-48 horas post-tratamiento permitirá estudiar la presencia de crisis en ratas neonatas no tratadas y tratadas y esclarecer si la inhibición de la glicoproteína p en combinación con topiramato reduce el número de crisis, intensidad y duración, y si este efecto es transitorio o permanente.

#### Requisitos:

El proveedor deberá garantizar el servicio del producto con los requisitos que establece los diferentes laboratorios de la fundación:

- Experiencia demostrable en el uso de EEG en pequeños roedores (tamaño de ratón o rata neonata)
- Uso de Instalaciones acreditadas para el manejo de animales de experimentación
- Experiencia demostrable en la realización de estudios longitudinales de EEG (>24-48 h) en roedores pequeños sin anestesia y restricción de movimiento
- Experiencia demostrable en el análisis de señales de EEG y EMG, espectros de potencia y distribución de bandas de frecuencia, acoplamiento fase-amplitud y estudio de patrones anómalos de actividad rítmica cerebral.

#### COMPROMISO DEL SERVICIO:

El adjudicatario se compromete a:

1. Que las instalaciones de registro de EEG estén acondicionadas en temperatura, humedad y ciclo luz-oscuridad adecuados para la experimentación.

Todo ello, en base a cumplir lo previsto por la normativa de prevención de riesgos laborales, de la Ley 31/1995, artículo 41, Obligaciones de los fabricantes, importadores y suministradores.

#### PLAZO DE EJECUCIÓN:

El plazo de ejecución del contrato será de 3 años.

#### UBICACIÓN:

La prestación se desarrollará en las instalaciones del prestador de servicios, preferiblemente a una distancia de no más de media hora de las instalaciones de la Fundación, para evitar trayectos estresantes para los animales de experimentación.



Dr. José Martínez Orgado  
Investigador Principal