

JENNY C. SALDAÑA

REBECA CHÁVEZ-GENARO

IRIS MIRABALLES

Manejo de animales tradicionales en experimentación



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

COMISIÓN HONORARIA DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL
COMISIÓN SECTORIAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

JENNY C. SALDAÑA

REBECA CHÁVEZ-GENARO

IRIS MIRABALLES

Manejo de animales tradicionales en experimentación



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

COMISIÓN HONORARIA DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL
COMISIÓN SECTORIAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

Manejo de Animales Tradicionales en Experimentación

2.^a edición

Montevideo, Uruguay, 2023

e-ISBN: 978-9974-0-2060-3

Responsables de esta edición

Dra. Jenny C Saldaña

*Prof.^a adjunta DT, Laboratorio de Experimentación Animal, Área Farmacología, Dpto. de Ciencias Farmacéuticas
Facultad de Química, Universidad de la República*

Dra. Rebeca Chávez-Genaro

Prof.^a agregada DT, Dpto. Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República

Dra. Iris Miraballes

*Prof.^a adjunta, Inmunología Clínica, Dpto. Bioquímica Clínica, Biotecnología / Instituto Polo Tecnológico de Pando, Fac.
de Química, Universidad de la República*

Imagen de tapa: *Rattus norvegicus* en el Laboratorio de Experimentación Animal de Fac. de Química.

Foto tomada por la Dra. Inés Carrera

Quienes estuvimos a cargo de la escritura y edición de segunda edición de este manual queremos agradecer por sus aportes a:

Dr. Martin Breijo

*Prof. agregado DT, responsable de la Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación,
Facultad de Medicina, Universidad de la República*

Dra. Natalia Uriarte

Prof.^a adjunta DT, Laboratorio de Neurociencias, Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Dra. Annabel Ferreira

Prof.^a agregada, Sección Fisiología y Nutrición, Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Dra Daniella Agrati

Asistente DT, Sección Fisiología y Nutrición, Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Dra. Patricia Genovese

Prof.^a adjunta, Histología y Embriología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República

Las responsables de esta edición queremos agradecer especialmente
por la lectura crítica de este libro y los importantes aportes brindados para él a:

Dr Miguel Ángel Ayala

*Prof. titular y director del Laboratorio de Animales de Experimentación,
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de la Plata*

Contenido

PRESENTACIÓN	7
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	8
CAPÍTULO II. UTILIZACIÓN DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN EN URUGUAY. UNA HISTORIA QUE ACOMPAÑÓ LA EVOLUCIÓN SOCIAL, LA EDUCACIÓN Y LA SALUD DE LOS URUGUAYOS	11
CAPÍTULO III. MODELO ANIMAL	17
Experimentación animal	17
Generalidades de los animales de laboratorio	18
CAPÍTULO IV. ANIMALES DE LABORATORIO MÁS UTILIZADOS	22
Ratón	22
Rata	30
Cobayo	34
Conejo	39
CAPÍTULO V. VÍAS DE ADMINISTRACIÓN Y TOMA DE MUESTRAS	48
Vías de administración	48
Toma de muestras	52
CAPÍTULO VI. BIENESTAR Y ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL	63
Evaluación del bienestar animal	64
Conceptos básicos	65
Enriquecimiento ambiental	66
El bienestar y enriquecimiento ambiental según las especies	68

CAPÍTULO VII. ANESTESIA Y ANALGESIA	79
¿Qué es el dolor?	79
Anestesia	80
Objetivos de la analgesia y anestesia	82
Analgesia	89
CAPÍTULO VIII. EUTANASIA Y NECROPSIA	93
Eutanasia	93
Resumen de los Principios Generales Sobre Eutanasia	95
Necropsia	107
CAPÍTULO IX. MÁS ALLÁ DE LAS 3R'S... REFLEXIONES EN TORNO A LA ÉTICA EN EXPERIMENTACIÓN ANIMAL Y LAS EMOCIONES EN LOS ANIMALES DE LABORATORIO	116
Introducción	116
Emociones en animales no humanos: aportes desde la neurociencia afectiva	117
¿Qué implicancias acarrea para la discusión ética de la experimentación animal reconocer que los animales de laboratorio experimentan emociones?	118
Reflexiones finales	119
CAPÍTULO X. NOCIONES GENERALES SOBRE MÉTODOS ALTERNATIVOS AL USO DE ANIMALES DE LABORATORIO	122
Presente y futuro	122
¿Dónde buscar? ¿A quién acudir?	124
Conclusiones	125
ANEXO I. ORDENANZA SOBRE USO DE ANIMALES EN EXPERIMENTACION, DOCENCIA E INVESTIGACION UNIVERSITARIA	128
ANEXO II. Ley n.º 18.611. Utilización de Animales en Actividades de Experimentación, Docencia e Investigación Científica	138
ANEXO III. TABLAS	142

Presentación

DRA. REBECA CHÁVEZ-GENARO

Coordinadora de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA), Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) de la Universidad de la República

Desde sus inicios en el año 2000, la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA), ha buscado la aplicación de medidas que contemplen el buen uso de animales en investigación reconociendo su valor intrínseco y que los mismos sean respetados de acuerdo con los principios generales de reemplazo, reducción y refinamiento que se establecen en la Ordenanza sobre el Uso de Animales en Experimentación, Docencia e Investigación Universitaria.

Además del dictado de cursos que permiten la formación de recursos humanos en esta área, ha recopilado una serie de recomendaciones sobre el uso de animales de experimentación que han dado lugar a la publicación de dos pequeños manuales, «Manejo de Animales de Experimentación» en el año 2006 y otro dedicado a la «Experimentación con Animales no Tradicionales en Uruguay» (2018). Como en todas las ramas del conocimiento, la ciencia del uso de animales de experimentación está en continuo cambio, se mejora y adapta posibilitando a su vez la obtención de mejores resultados. Este principio es lo que nos ha llevado a la publicación de esta segunda edición del *Manual del manejo de*

animales tradicionales de experimentación que aquí presentamos.

Esta nueva edición pretende ser una guía que mejore y actualice los principales aspectos relacionados con el uso de animales tradicionales en investigación y docencia y que aseguren el bienestar animal, que se presentaban en la primera edición.

Capítulo I

Introducción

El uso de animales en experimentación ha sido sometido a fuertes cuestionamientos éticos en las últimas décadas por parte de organizaciones sociales pertenecientes a distintos países. Se ha procurado por medio de las organizaciones científicas y la industria reemplazar el uso de animales por métodos alternativos; sin embargo, a pesar de los esfuerzos en el desarrollo de estos métodos no se puede discutir la importancia que aún tienen los animales de laboratorio en la investigación y la docencia. En muchos casos son insustituibles, y es en estos casos que siempre se procura minimizar su número. Para ello es fundamental asegurar el bienestar, calidad genética y estado sanitario de los mismos. Deben estar claramente definidas las características genéticas, sanitarias, ambientales, el manejo ético y el bienestar de los animales utilizados (*Guide for The Care and Use Of Laboratory Animals*, 2011).

Quienes empleamos animales para experimentación en investigación y docencia debemos asumir de forma responsable y ética el uso de animales aplicando siempre el principio de las 3R's: reducir, refinar, reemplazar (Russell y Burch, 1959) además de cumplir con las normas vigentes.

En la actualidad y en el ámbito internacional existen leyes y normativas tanto a nivel público como privado, siendo pionero en ello el Reino Unido. Marshal Hall (1790-1857, fisiólogo inglés) quien estaba a

favor de la experimentación con animales expresaba: «por desgracia todos los experimentos con animales relacionados al estudio de la fisiología les provocan mucho dolor y sufrimiento»; en 1832 propone cinco principios que podrían regir la experimentación animal, comenzando así el debate entre sus colegas y la creación de una sociedad científica que supervisara dicho trabajo (Smith y Hawkins, 2016):

- la experimentación no se debe practicar si se la puede sustituir con simple observación;
- ningún experimento se debe hacer sin un objetivo claramente definido y que sea posible de obtener;
- los científicos deben estar bien informados acerca de los experimentos de sus colegas, para evitar repeticiones;
- los experimentos justificables deben llevarse a cabo con la imposición del menor sufrimiento posible (a menudo mediante el uso de animales inferiores, menos sensibles);
- cada experimento debe realizarse bajo circunstancias que proporcionen resultados lo más claros posible, evitando así la necesidad de repetirlos.

En 1876 surge en Inglaterra la primera ley sobre el uso de animales de experimentación «Cruelty to Animals Act», exigiéndose ya desde ese momento licencias especiales para las personas que utilicen animales en experimentación. Esta ley siguió como tal hasta 1986 cuando fue actualizada y pasó a llamarse «Animal Scientific Procedures Act (ASPA)» (<http://www.legislation.gov.uk/ukpga/1986/14/contents>).

En Estados Unidos se elaboraron varios documentos sobre recomendaciones en el uso de animales de laboratorio, y en 1993 se publica *Guide for Laboratory Animal Facilities and Care* que, luego de haber sido actualizada en varias oportunidades, pasó a llamarse *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*; su última edición (la 8ava en 2011), cuenta también con su edición en español. Esta guía es ampliamente consultada ya que incluye recomendaciones para los animales más utilizados en investigación y docencia. En 1966, surge además la «Animal Welfare Act» siendo su última actualización en 2017; esta normativa a pesar de regular la experimentación con animales, los animales de exhibición, su transporte etc., tiene una gran debilidad ya que no incluye a las ratas y los ratones.

En Brasil en 2008 se aprueba la Ley n.º 11794 sobre el uso de animales de experimentación conocida

como Ley Arouça (http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/11794.htm)

En Uruguay, la Universidad de la República en 2000 propone las primeras normativas sobre del tema, la Ley Nacional aparece en 2009:

1. Ordenanza Universitaria: «Uso de Animales en Experimentación, Docencia e Investigación Universitaria» <http://www.dgjuridica.udelar.edu.uy/wp-content/uploads/2016/04/Ordenanza-186.pdf> (Anexo 1)
2. Ley Nacional n.º 18741: «Tenencia Responsable de Animales» <https://legislativo.parlamento.gub.uy/temporales/leytemp9406279.htm>
3. Ley Nacional n.º 18.611: «Procedimientos para la Utilización de Animales en Actividades de Experimentación e Investigación Científica» <https://www.impo.com.uy/bases/leyes/18611-2009/5> (Anexo 2)

La normativa Universitaria creó además la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA), en el ámbito de la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) de la Udelar, (<https://chea.edu.uy>). Dicha comisión está integrada por delegados de los diferentes servicios universitarios que utilizan animales y tiene como prioridad formar y actualizar a los usuarios de animales de experimentación en el conocimiento de esta disciplina, así como elaborar y actualizar protocolos de experimentación, y velar

por el cumplimiento de las reglamentaciones y normas vigentes.

A nivel nacional La Ley n.º 18.611, exige la existencia de una Comisión de Ética en Uso de Animales (CEUA) en cada institución que utilice animales para investigación o docencia y crea la Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA), la cual depende y funciona en el Ministerio de Educación y Cultura (MEC) (www.cnea.gub.uy). La CNEA es presidida por el Ministro de Educación y Cultura o quien este designe y la integran delegados de instituciones públicas y privadas involucradas en el uso de animales de experimentación, así como delegados de organizaciones protectoras de animales con personería jurídica. Una de las competencias de la CNEA consiste en mantener actualizados los siguientes registros:

- las instituciones que utilicen animales con fines de experimentación, docencia o investigación;
- las personas acreditadas en las diferentes categorías existentes para el uso de animales de experimentación, y
- los protocolos aprobados por las diferentes comisiones de ética en uso de animales (CEUA).

Junto a la creación y reglamentación de normativas internacionales también surgen sociedades científicas relacionadas al uso de animales como por ejemplo: el International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS) (<https://iclas.org>); la Federation of European Laboratory Animal Science

(FELASA) (<http://www.felasa.eu>); y la Federación de Sociedades Sudamericanas de Ciencia de Animales de Laboratorio (FESSACAL) (<https://www.fessacal.org>) entre otras. En Uruguay existe la Asociación Uruguaya de Ciencia y Tecnología de Animales de Laboratorio (AUCyTAL) (<https://www.aucytal.org>), integrante de la FESSACAL e ICLAS.

Nuestro país primero en la Udelar y luego a nivel nacional, lleva a cabo un proceso de concientización, regularización y desarrollo en el uso de animales de experimentación, con el fin de acercarse a los estándares establecidos internacionalmente, siendo el segundo país en América del sur, luego de Brasil que contó con una ley nacional específica para el uso de animales de experimentación. Se crearon 4 Categorías de Acreditaciones Personales según la actividad a desarrollar:

- **A:** personal dedicado al cuidado, manejo y mantenimiento de animales;
- **B:** ayudante de Investigación, docente de clases prácticas con animales;
- **C1:** responsable de Bioterios o Laboratorio de experimentación Animal, y
- **C2:** responsable de proyectos de investigación.

Este manual, al igual que la edición anterior, se elaboró con el fin de apoyar a los interesados en el adecuado manejo de animales tradicionales de experimentación (ATE).

Bibliografía

Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (2011): Institute for Laboratory Animal Research, National Research Council, Eighth Edition. <http://www.nap.edu/catalog/12910.html>

Russell W y Burch R (1959): The Principles of Humane Experimental Technique. London: Methuen & Co. Limited. 252 pp

Smith y Hawkins (2016): «Good Science, good sense and good sensibilities. The Three Rs of Carol Newton», *Animals*, 6, 70, pp. 1-6; doi: 10.3390/ani6110070

Capítulo II.

Utilización de animales de experimentación en Uruguay.

Una historia que acompañó la evolución social, la educación y la salud de los uruguayos

DR. MARTÍN BREIJO

Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación, Facultad de Medicina, Universidad de la República

El antecedente más inmediato al uso de animales con fines de docencia e investigación en Uruguay se remonta a la segunda mitad del siglo XIX.

Particularmente al año 1847, cuando en el College de France de París se inician los cursos de Fisiología Experimental dictados por Prof. Claude Bernard. Este médico fisiólogo e investigador, es considerado el padre de la *medicina científica* por introducir la demostración experimental a los contenidos teóricos que sostenían la medicina de la época. En estos cursos, a través de disertaciones orales y demostraciones prácticas realizadas en conejos, perros y caballos, se enseñaba sobre la digestión gástrica e intestinal, la fisiología cardíaca y el funcionamiento del sistema nervioso. Los trabajos de Bernard generaron un punto de inflexión en el conocimiento médico y establecieron las reglas para que la medicina se transforme verdaderamente en una ciencia. Fueron alumnos del Prof. Bernard, tres estudiantes uruguayos que estudiaron medicina en Francia, antes que existiera esta

carrera en Uruguay, los doctores Teodoro Vilardebó, F.A. Vidal y Pedro Visca (Mané Garzón 1989).

El 13 de diciembre de 1875 se decreta en Uruguay, la creación de la Facultad de Medicina y ya en el año 1876 quedaron instaladas las cátedras de Anatomía y Fisiología. Los catedráticos y sus docentes accedieron a sus cargos por concurso de oposición. En particular, para el desarrollo de la prueba práctica del primer concurso de anatomía se solicitó contar con tres cadáveres, un perro y varias aves (Mané Garzón 2000). Es así que comienzan las actividades de la joven Facultad de Medicina, en un marco de austeridad y gran esfuerzo. Inicialmente se realizaron actividades exclusivamente docentes, pero lentamente se fueron incorporando actividades de investigación. En informe redactado por el Dr. Morelli, catedrático de Fisiología desde 1894 al Sr. Decano Dr. Elías Regules, explica las dificultades en la adquisición de equipamiento desde el exterior y como esto influye

en el desarrollo de las prácticas experimentales y de trabajos de investigación originales. Asimismo, describe algunas dificultades asociadas a la disponibilidad de animales para las actividades experimentales; «Hemos luchado en la primera mitad del año escolar con dificultades inmensas para conseguir el número suficiente de ranas, cuises y conejos para experiencias; el único animal de provisión regular fue el perro que nos compensaba la falta de otros animales» (Mané Garzón 2000). Más adelante en el mismo texto menciona «Es verdaderamente extraño que no haya en el departamento personas que se quieran encargar de la cría en escala de los animales referidos». Por otra parte, hace referencia a las condiciones precarias de alojamiento en los que se mantenían los perros y la necesidad de mejorarlas. En la misma carta sugiere trasladar a los perros a un lugar apartado «con el objeto de no incomodar con sus gritos, el trabajo de los laboratorios y las clases que tienen lugar en el anfiteatro contiguo».

En la segunda mitad del siglo XIX, otras áreas de la medicina también se interesan en la medicina experimental. Los hallazgos de Louis Pasteur en Francia sobre la teoría germinal de las enfermedades infecciosas, el desarrollo de la técnica de vacunación a partir de cultivos bacterianos debilitados y los aportes de Robert Koch, quien aísla en 1882 el bacilo de la tuberculosis, hacen de la bacteriología y las enfermedades infecciosas una disciplina en expansión. Como consecuencia de estos avances y en reconocimiento de estas dos figuras de la ciencia, se crea en Francia el Instituto Pasteur en 1888 y en 1891 el Instituto Robert Koch en Alemania. En este período, la salud y la higiene pública requerían que cada sociedad contara con un centro de aplicación, difusión y creación de conocimiento para lograr el bienestar social, individual y colectivo. Uruguay no fue ajeno a esa corriente y el 16 de marzo de 1896 crea el Instituto de Higiene Experimental. El rector de la Universidad, Alfredo Vázquez Acevedo, cuando se refirió a su creación expresó: «se trata de un evento feliz, trascendental, que, en el orden científico, puede considerarse el más grande de la República después de la fundación de la Universidad» (Mané Garzón 2000). Este Instituto fue dirigido inicialmente por el bacteriólogo y patólogo italiano José Sanarelli, el cual inició un camino de docencia e investigación en microbiología, seroterapia y vacunas a nivel nacional que aún permanece.

Los animales de experimentación fueron claves para lograr los avances en bacteriología que se observaron en este período en el mundo. Pollos, ovejas y cobayos permitieron demostrar el potencial de la

vacunación. En estos sujetos se reprodujeron enfermedades a través de la inoculación de cultivos puros y el posterior aislamiento del agente bacteriano de los animales. Robert Koch estableció en sus postulados que para determinar la etiología de una enfermedad eran necesarios su reproducción experimental y el aislamiento del agente causante en esos animales. Por tal razón, estos institutos contaron con instalaciones para la producción y mantenimiento de los animales más utilizados. En el caso del Instituto de Higiene, en 1936, inaugura su campo experimental denominado Servicio Seroterápico, en un predio de 180 hectáreas donde aún se producen bovinos, ovinos y cobayos con objetivos productivos y experimentales. En este predio, a principio del siglo XX se inmunizaban caballos para la producción de antisueños de uso humano, debido a que era el tratamiento de elección de diversas enfermedades infecciosas (ver foto al final del capítulo). En el Instituto de Higiene, se produjo el suero antidiftérico (1900), antitetánico (1901), antipestoso, antimeningocócico (1913) y más cercano en el tiempo el suero antiofídico. Los avances biomédicos y los cambios generados a lo largo del siglo fueron modificando los cometidos actuales de este servicio.

El Instituto de Higiene, con su plataforma también colaboró con los inicios de la medicina veterinaria en Uruguay. Probablemente por sus antecedentes en el uso de animales con fines experimentales y la necesidad de desarrollar especialistas en salud animal, en 1903, bajo el rectorado del Dr. Claudio Williman, el Presidente de la República, José Batlle y Ordóñez aprueba el Decreto que establece los estudios de

Veterinaria anexos a la Facultad de Medicina. Es así, que, en 1905, nueve estudiantes inician los cursos de veterinaria dictados en el Instituto de Higiene Experimental. En 1910, inspirada en la Facultad de Veterinaria de Alfort, Francia, se inician las edificaciones de la nueva Facultad, en una Quinta adquirida en su momento a la familia Taranco en el camino Larrañaga. Hasta el año 2021, esta construcción, fue la sede de la Facultad de Veterinaria del Uruguay.

Si bien los animales de mayor porte (equinos, ruminantes, perros y conejos) eran los de elección para realizar estudios de fisiología, neurobiología, bacteriología y nutrición, la utilización de roedores (rata y ratón) para la medicina experimental también tuvo su espacio. Los primeros registros de uso del ratón como animal de experimentación fueron en 1664, cuando Robert Hooke empleó ratones para estudiar las consecuencias biológicas de un incremento en la presión de aire. Sin embargo, la expansión del uso de ratones sucedió años más tarde, concretamente al principio del siglo XX de la mano de los genetistas. Los experimentos de Lucien Cuénot y William E. Castle (a principios del 1900) sobre la herencia del color del pelaje, sirvieron para confirmar que las leyes de Mendel podían ser aplicadas también a los mamíferos (Benavidez 2003). Es en este período se crean las primeras líneas de roedores estandarizadas, tal como las concebimos en la actualidad. Todo comenzó cuando Abbie Lathrop en su comercio en Massachusetts, Estados Unidos empezó a criar ratones para la venta (principalmente como mascotas) y el Bussey Institute dirigido por William Castle, le empezó a comprar los animales para sus estudios

de genética. Una de las principales contribuciones del grupo de Castle, fue la creación de las primeras líneas genéticamente homogéneas (consanguíneas) de ratones de laboratorio.

Culminada la segunda guerra mundial, el ratón volvió a tener un gran protagonismo, cuando se comenzó a evaluar el riesgo que generaba la utilización de la energía nuclear para el ser humano. A partir de los años 50, millones de ratones fueron irradiados en EE. UU. Y Gran Bretaña generando cientos de roedores portadores de mutaciones específicas que se criaron para su estudio. Rápidamente, el ratón de laboratorio se transformó en el animal de experimentación por excelencia, para dilucidar procesos biológicos como el cáncer, el determinismo genético, la biología del desarrollo, el funcionamiento del sistema inmune entre otros (Benavidez 2003).

En la década de 1980, otro avance científico consolida al ratón como animal de elección para la experimentación, la publicación del primer animal transgénico en 1981 (Costantini 1981). A partir de ahí, una sucesión de hallazgos cambia el potencial de generación de conocimiento en biología a través del uso de animales como modelos experimentales. En 1989, Mario R. Capecchi, Martin Evans y Oliver Smithies publican el procedimiento de obtención del primer ratón *knock-out* y en 1998 el procedimiento de obtención del primer ratón clonado (Capecchi 1988; Wakayama 1998). A partir del año 2002 se encuentra disponible la secuencia completa del genoma del ratón y dos años más tarde la de la rata.

La ciencia en Uruguay no fue ajena a los cambios de modelos experimentales que se observaban en el mundo y lentamente la utilización de roedores de laboratorio se fue incrementando. A finales de la década de 1990, un importante núcleo de técnicos e investigadores utilizaban roedores de laboratorio para sus trabajos. Sin embargo, la producción y la experimentación con estos animales se realizaban en pequeñas instalaciones con escasos recursos humanos y pobres infraestructuras edilicias.

A medida que avanzaba la investigación en Uruguay, las condiciones de producción de animales de laboratorio no respondían a las necesidades nacionales y a las exigencias internacionales de calidad de los animales de experimentación. El avance del conocimiento sobre la importancia de la base genética en la respuesta fisiológica o en la aparición de una patología exigían indirectamente conocer el fondo genético de los animales en los que se hacía un experimento. En el mismo sentido, se identificó que las enfermedades subclínicas en roedores afectan las respuestas fisiológicas e inmunológicas a un estímulo. Estos conceptos generaron la necesidad de utilizar animales de calidad definida tanto desde el punto de vista genético como microbiológico. La definición de parámetros de calidad de los animales de experimentación, empezó a ser exigida para las publicaciones en revistas internacionales.

La creación del primer bioterio de roedores de calidad genética y microbiológica definida en Uruguay fue en el año 2000, en la Dirección de Laboratorios Veterinarios del Ministerio de Ganadería Agricultura

y Pesca (MGAP). El mismo se creó en el marco de un convenio entre el MGAP y la agencia de cooperación internacional de Japón (JICA). Estos roedores empezaron a cubrir las necesidades del ministerio (en tareas de diagnóstico de patógenos y control de medicamentos) y de la Universidad de la República, quien le empezó a solicitar animales para sus líneas de investigación.

En ese mismo año, un grupo multidisciplinario de investigadores de la Universidad de la República, promueven la redacción de la «Ordenanza sobre uso de animales en experimentación, docencia e investigación universitaria» (Res. n.º 11 de C.D.C. de 21/XII/1999, Distr. n.º 295/99, D. O. 21/II/2000). Esta ordenanza creó la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA), una comisión central de la Universidad, integrada por representantes de los servicios universitarios donde se desarrolla experimentación animal (facultades de Ciencias, Medicina, Química, Agronomía y Veterinaria). En la misma, se establece que la CHEA se encargará de desarrollar las políticas universitarias de experimentación animal y de adecuar la actividad experimental nacional a las exigencias y regulaciones internacionales. Es así, que, a inicios del siglo XXI en la Universidad de la República, comienza un camino de formalización del trabajo con animales de experimentación.

En 2002, se inicia el dictado de cursos sobre uso y manejo de animales de experimentación, cuya aprobación le permite al investigador acceder a una acreditación personal para poder experimentar

con animales. En paralelo, en cada servicio universitario se instalan las Comisiones de Ética en el Uso de Animales (CEUA), encargadas de evaluar la validez académica y ética de las propuestas institucionales de experimentación animal. Poco a poco, se fueron formalizando las estructuras académicas con función de producción y experimentación con animales. En 1999, el Consejo de Facultad de Química, Universidad de la República (Udelar), crea el Laboratorio de Experimentación Animal (LEA), el cual pertenece al Área Farmacología del Departamento de Ciencias Farmacéuticas (<http://farmacologia.fq.edu.uy>). Es una unidad académica donde se realizan tareas de investigación, docencia, extensión y prestación de servicios al sector productivo. Es el primer LEA habilitado por el MSP para realizar ensayos según las normativas OECD. En el mismo camino, la Facultad de Medicina inicia la formalización de su estructura experimental en el año 2003, y en el año 2009 crea la primer Unidad docente de la Udelar abocada a la ciencia de animales de laboratorio y al desarrollo de modelos experimentales; la Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación (URBE) (Expediente 070011-002651-09).

En esta misma década otro evento político favoreció el desarrollo académico en general y la ciencia de animales de laboratorio en Uruguay; el 14 de julio de 2004 el Gobierno nacional, bajo la presidencia del Dr. Jorge Batlle y el gobierno de Francia, acuerdan la creación de la filial Montevideo del Instituto Pasteur. Este Instituto abrió sus puertas en febrero del 2007, contando con una plataforma de biotecnología

de animales de laboratorio, la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación (UATE). En estos años, esta unidad se ha desarrollado en el campo de la modificación del genoma animal (ratones, ratas y rumiantes). A través de la aplicación de varias técnicas, como la microinyección pronuclear, la recombinación homóloga en células madre embrionarias y el sistema CRISPR/Cas9, fue generando animales genéticamente modificados, que son utilizados como modelos de investigación en la región y para el mundo.

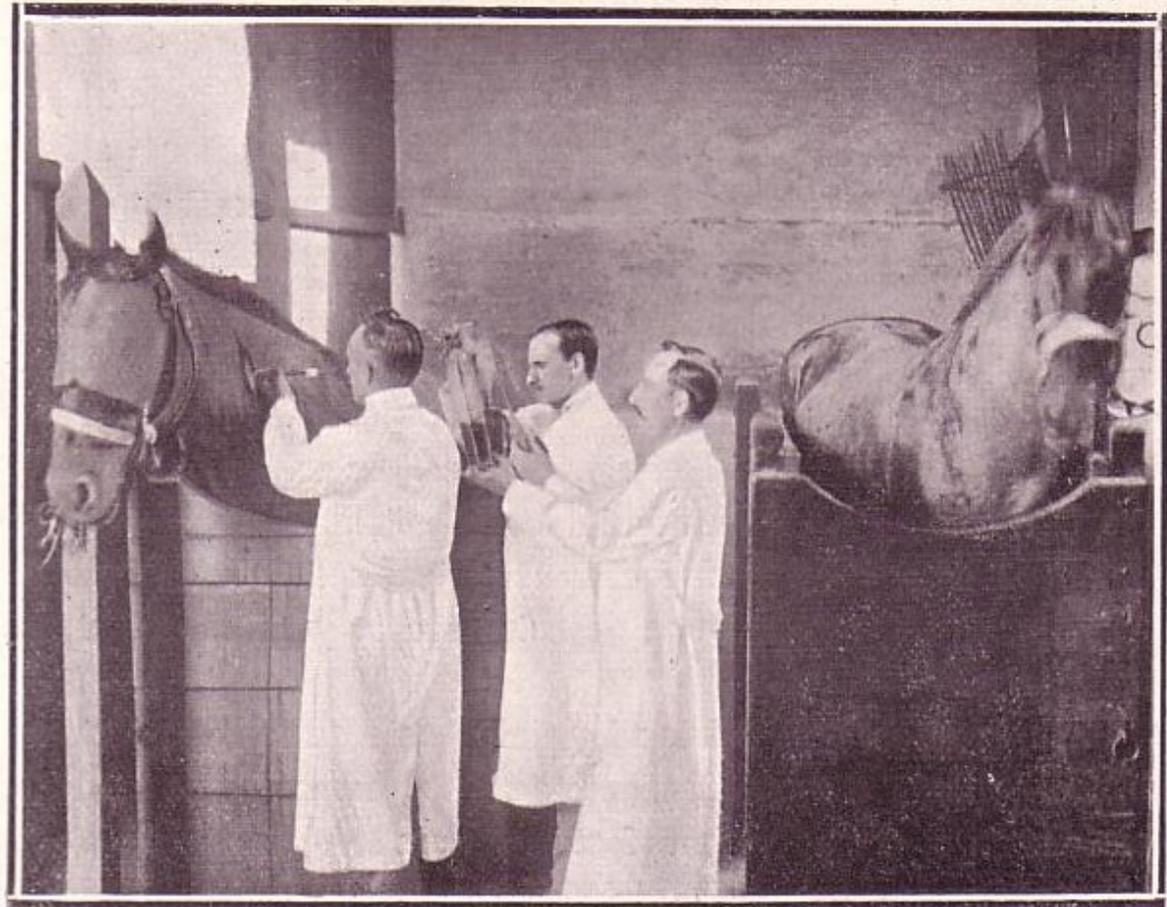
Con el crecimiento de la investigación en Uruguay, también crecía la necesidad de extender al sector no universitario, la normativa regulatoria de las actividades experimentales con animales. Es así, que bajo iniciativa de la CHEA de la Udelar, con el apoyo de la Sociedad de Medicina Veterinaria (SMV) y de la Asociación Uruguaya de Ciencia y Tecnología de Animales de Laboratorio (AUCYTAL) se trabajó en la redacción de un proyecto de ley que finalmente se aprobó en octubre 2009. A partir de ese momento, la Ley n.º 18.611, denominada «Procedimientos para la utilización de animales en actividades de experimentación, docencia e investigación científica» comenzó a regular la cría y la utilización de animales en actividades de experimentación, docencia e investigación científica, en todo el territorio nacional. Asimismo, la ley creó a la Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA), que es presidida por el Ministerio de Educación y Cultura, e integrada por delegados de 4 ministerios (MEC, MGAP, MVOTMA y MSP), de la Cámara de Industria, de asociaciones civiles (SMV, Aucytal, Sociedad Uruguaya de Biociencias) y de la sociedad protectora

de animales. La ley 18611, obligó a todas las instituciones que desarrollan docencia o experimentación con animales, a conformar una comisión de ética en el uso de animales (CEUA) y a tener acreditado a todo su personal involucrado en su manejo.

En los últimos 12 años, continuaron mejorando las capacidades de investigación a nivel nacional y con ellas las infraestructuras experimentales. En 2010, se inaugura el Centro Uruguayo de Imagenología Molecular, bajo la presidencia de José Mujica. Este centro de investigación y de diagnóstico de pacientes oncológicos, también cuenta con un bioterio de roedores SPF (Specific Pathogen Free) para el desarrollo de sus actividades experimentales. Por su parte, la Universidad de la República, en 2012 inauguró un bioterio piloto de roedores SPF, apuntando a la creación de un bioterio central de la Universidad, cuya inauguración se espera para 2023 en el predio de la nueva Facultad de Veterinaria.

Si bien los roedores son los animales más utilizados en experimentación animal, el concepto de cuidado de los animales de experimentación y la aplicación de las 3R's, está extendido a todas las especies vertebradas utilizadas para la docencia y generación de conocimiento. Es así que el trabajo con animales de interés productivo, de vida libre o de compañía en actividades de investigación, es objeto de las mismas políticas de cuidado y responsabilidad que los primeros. Uruguay en la actualidad es uno de los países más adelantados en América Latina en relación con su normativa. A su vez, cuenta con ámbitos estructurales (CNEA, CHEA, CEUA) donde la sociedad

puede discutir dilemas éticos y académicos en relación con el uso de animales en experimentación. Esto le da fortaleza a un sistema que evoluciona todos los días.



Instituto de Higiene Experimental. (Servicio Seroterápico)

Producción de antisueros en el Servicio Seroterápico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina. Estación de inmunización y extracción de plasma en equinos.

Bibliografía

- Benavides E, Guenet J (2003): Manual de genética de roedores de laboratorio. Principios básicos y aplicaciones. Universidad de Alcalá. Madrid, España.
- Capecchi M. (2008): The first transgenic mice: an interview with Mario Capecchi. Interview by Kristin Kain. Dis Model Mech. Nov-Dec;1(4-5):197-201. doi: 10.1242/dmm.001966. PMID: 19093023.
- Costantini F, Lacy E. (1981): Introduction of a rabbit beta-globin gene into the mouse germ line. Nature. 1981 Nov 5; 294 (5836):92-4. doi: 10.1038/294092a0. PMID: 694 5481.
- Mané Garzón F (1989): Primer curso de Fisiología experimental dictado por Claude Bernard. Apuntes tomados por Teodoro M. Vilardebó. Academia Nacional de Medicina.
- Mañé Garzon F, Mazzella H (2000): Historia de la Fisiología en el Uruguay. Edición homenaje en el 150 aniversario de la Universidad de la República. Montevideo Editorial OFICINA DEL LIBRO-AEM, 2000. ISBN 9974-31-106-X.
- Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. (1998): Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. Nature. Jul 23;394(6691):369-74. doi: 10.1038/28615. PMID: 9690471.

Agradecimientos

A Biname/Cendin Facultad de Medicina Udelar, por su colaboración en la búsqueda de información relacionada al presente trabajo

Capítulo III. Modelo animal

Consideraciones éticas y de sentido común restringen la investigación en humanos, por lo que el uso de modelos animales ha jugado un rol crítico en el entendimiento de los procesos de salud humana y animal. La creación de entidades tales como animal de laboratorio y reactivo biológico han sido de gran valor para el diseño y prueba de diferentes regímenes de tratamiento. El uso de animales en estudios científicos tendrá respaldo ético si se demuestra que no existen métodos alternativos capaces de sustituirlos, que el experimento traerá conocimientos científicos relevantes y que hay una preocupación clara del investigador con el bienestar animal, con una reducción del número de animales y con el refinamiento de sus técnicas (Gomes de Macedo Braga, 2010).

Un animal de laboratorio se define como: «Cualquier ser vivo vertebrado, no humano incluyendo las formas fetales o embrionarias en el último tercio de gestación, producido y utilizado con fines científicos» (Zuñiga 2016; National Research Council 2017). Actualmente en la normativa europea sobre el uso de animales de experimentación también se considera a los Cefalópodos dentro de este grupo «ya que existen pruebas científicas de su capacidad de experimentar dolor, sufrimiento, angustia y daño duradero» (Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo).

El concepto *reactivo biológico* delimita al animal de experimentación, utilizado en función de un tema de estudio y es capaz de proporcionar una respuesta confiable y reproducible. Su pureza se debe vigilar, controlar y contrastar al igual que cualquier otro reactivo químico o físico, sin olvidar que su posible contaminación biótica o abiótica puede afectar los resultados a obtener (Zuñiga, 2016). La posibilidad de reproducir los resultados experimentales está limitada por su propia variabilidad; de tal forma que al reactivo biológico se le debe exigir:

- a. Homogeneidad somática: igualdad de sexo, peso y edad. Fácil en roedores y difícil en animales grandes carnívoros, primates, herbívoros
- b. Homogeneidad genética: lo dará la tasa de consanguinidad
- c. Homogeneidad sanitaria: permite evitar resultados no deseados debido a patologías preexistentes en el animal

Dichos parámetros han llevado al establecimiento de diferentes tipos o categorías de animales de laboratorio, así como de las instalaciones donde se producen o mantienen. El objetivo final busca tener animales biológicamente estandarizados, y con controles genéticos, sanitarios y ambientales.

Experimentación animal

Toda actividad que tiene como misión evidenciar o aclarar fenómenos biológicos sobre especies animales determinadas y que pueda afectar el estado de bienestar animal, se define como experimentación animal.

En dicha actividad no existe un modelo perfecto extrapolable al hombre, pero existen una infinidad de modelos experimentales, cuyas respuestas fragmentarias incrementan el significado biológico del fenómeno observado (Zuñiga, 2016). La importancia de la interpretación de los resultados y la apreciación de la extrapolación de estos de una especie a otra depende del modelo experimental utilizado. Minimizar las variables no-experimentales optimiza el uso de animales experimentales. Las condiciones ambientales en que se crían y experimentan los animales influyen decisivamente en las respuestas a los distintos tratamientos.

Algunos de los principales factores ambientales que afectan a los animales pueden clasificarse en:

1. **climáticos:** temperatura, humedad, ventilación, etc.;
2. **fisicoquímicos:** iluminación, ruido, composición del aire, cama, etc.;

3. **habitacionales:** forma, tamaño, tipo de jaula, número de animales en ella, etc.;
4. **nutricionales:** tipo de dieta, tratamiento o no del agua, esquema de administración de la dieta, y
5. **sanitarios:** presencia o no de bacterias, virus y parásitos.

Generalidades de los animales de laboratorio

Hasta hace unos años, aproximadamente el 95 % de los animales utilizados en investigación eran ratones y ratas. En la actualidad, el gran desarrollo en producción y uso de Zebrafish ha cambiado estos porcentajes (Dutta, 2016). El último informe presentado por Gran Bretaña (Annual Statistics of Scientific Procedures on Living Animals Great Britain, 2021) muestra que en 2021 el número de procedimientos que involucraron el uso de animales fue de 3,06 millones mostrando un aumento del 6 % respecto al año anterior. De este informe se desprende que aproximadamente el 51 % de los procedimientos experimentales correspondió a investigación básica; la producción de animales incluyendo los genéticamente modificados disminuyó un 8 %, el 92 % de los procedimientos utilizó ratones peces y ratas para experimentación y producción y el 53 % de estos procedimientos experimentales se dedicaron a experimentación básica (inmunología, oncología y neurociencia).

Algunas de las razones del porqué los ratones siguen estando a la cabeza de los modelos biológicos más utilizados, son:

- fácil cuidado y mantenimiento;
- costo accesible de manutención;
- alta capacidad reproductiva;
- tiempo corto de generación;
- gran número de cepas bien definidas y stocks disponibles;
- adaptabilidad a diferentes técnicas de producción;
- diversidad de características específicas que los convierten en modelo, y

La producción de los animales de laboratorio se realiza con diferentes técnicas: (<https://geneticabioteorio.wordpress.com/animestandarizados/>) (Benavides 2003; Chia 2005).

Debido a las diferentes técnicas para la producción de los animales de laboratorio existe una terminología asociada a ello, a saber (<https://geneticabioteorio.wordpress.com/animestandarizados/>) (Benavides 2003; Chia 2005).

Consanguínea o endogámica (Inbred): Se trata de animales endocriados, pertenecientes a una

población cerrada genéticamente uniforme. El continuo entrecruzamiento entre hermanos logra que luego de 20 generaciones se obtenga un 98 % de homocigosis. La homogeneidad genética de estos animales permite que la composición genética no tenga que ser considerada como una variable de investigación y asumir que la variabilidad de los resultados se pueda atribuir a factores ambientales o metodológicos. Este hecho hace posible la comparación de resultados experimentales de diferentes laboratorios. La asociación de las características fijadas en cada cepa genera una individualidad en relación con sus cualidades, particularidad que deberá tomarse en cuenta en el momento de elegir el modelo para un trabajo de investigación. Según H. Gruneberg: «la introducción de ratones *inbred* en la biología es comparable, en importancia, con el descubrimiento de la balanza analítica para la química» (Gomes de Macedo Braga, 2010).

Las características que presentan son: homocigosis, genotipo definido, depresión consanguínea, isogenidad, uniformidad, individualidad y universalidad.

Denominación: La nomenclatura de las líneas es indispensable y se debe seguir en forma rigurosa debido a que aporta información relevante:

6. el nombre de la cepa, y el nombre del criador se separan por una barra;
7. el nombre de la cepa precede la designación del criador;

8. el nombre de la cepa endocriada comienza con letra mayúscula, y
9. el nombre de los criadores se compone por una letra mayúscula o una letra mayúscula y de 1 a 3 letras minúsculas. Algunas veces los nombres pueden contener números.

Una cepa endocriada se puede dividir en subcepas y sublíneas. La subcepa se forma cuando dos colonias de la misma cepa de ratón son separadas después de la vigésima generación, pero antes de la generación cuarenta de la endocría, o cuando se produce una mutación en una colonia. Las subcepas se designan con un número o una letra luego del nombre de la cepa parental y separada por una barra. La letra o número designan al individuo o las instituciones que mantienen dichas subcepas.

Ejemplos: DBA/1J, DBA/1LacJ, y DBA/2J son subcepas de la cepa DBA: los números 1 y 2 identifican las subcepas, Lac es el código de laboratorio del Laboratory Animal Center at Carshalton, U.K., y J es el de The Jackson Laboratory.

Los animales obtenidos por este método se pueden usar en cualquier investigación realizable con roedores, excepto procesos de selección.

Híbridos F1: son resultado del primer cruzamiento de 2 cepas endogámicas. Todos los animales resultantes son isogénicos (todos genéticamente idénticos como gemelos homocigotos), pero heterocigotas en todos los genes en el que las cepas progenitoras

difieren. Son más adaptables a los cambios ambientales que las cepas originarias y tiene mayor vigor híbrido, solo se utiliza la primera generación.

Son características de estos animales: la heterocigosis, el genotipo definido, un mayor vigor híbrido, la isogenicidad y la uniformidad. Se los nombra mencionando siempre las abreviaturas de ambas líneas parentales, siendo la primera la línea materna seguida por F1. Por ejemplo la B6D2F1 (BDF1), surge del cruzamiento entre una hembra C57BL/6 y un macho DBA/2.

Son animales con aplicación semejante a los endogámicos y adecuados para estudios de carcinogénesis química.

Co-isogénicas (consanguíneas mutantes): se obtienen cuando en una cepa determinada de animales se produce una mutación espontánea con fenotipo observable. Si la mutación no se puede mantener en homocigosis, será mantenida en heterocigosis en la línea original. En ambos casos, la nueva cepa mutante se considera coisogénica porque su genoma es idéntico (isogénico) al de su línea hermana excepto en el locus mutante.

Sus características son similares a las consanguíneas, pero con rasgos genéticos exclusivos.

Este tipo de animales se utiliza sobre todo para el estudio de función de genes concretos.

Se identifican con el nombre de la cepa seguida por un guion y el símbolo del gen mutado. Ejemplo:

C57BL/6JEi-tth mutación tth (tumor tilted head) en la línea C57BL/6JEi.

Congénicas: los animales congénicos derivan del cruzamiento repetido (retrocruzamiento por al menos 10 generaciones) de animales portadores de un gen (o de un segmento cromosómico) con animales de cepa endocriada que normalmente no es portadora de dicho gen. Son genéticamente idénticos con excepción de un solo locus. La línea obtenida se mantiene en estado homocigota por cruzamiento entre hermanos. Es una forma de mantener genes deletéreos.

Sus características son similares a las coisogénicas, con aplicaciones semejantes a las anteriores y especialmente utilizadas en estudios de inmunología.

Se identifican con un nombre compuesto por dos partes (separadas por un punto): La primera es el nombre completo, o abreviado, de la línea de fondo (la que recibe el locus diferencial) y, luego del punto, se coloca la abreviatura de la línea donante, un guión y, seguido, el símbolo del locus o alelo diferencial. Por ejemplo, B10.129-H12b es una línea con fondo C57BL/10Sn (= B10), pero que difiere de esa línea original en el alelo H12b, derivado de la línea 129. Si el origen de la línea donante de la mutación es desconocido puede indicarse como B6.Cg-nkt, en donde «Cg» indica línea congénica.

Transgénicos o de inhibición selectiva: son animales que poseen un segmento de ADN exógeno. Existen varias técnicas para obtenerlos, entre ellas (Felmer,

2004) por microinyección pronuclear: el ADN es inyectado en un cigoto fertilizado, el estado genético es confirmado después del nacimiento y solo una pequeña proporción de animales nace con la modificación genética.

Gene Targeting (ES cells): Células madre embrionarias (disponibles solo en el ratón) son modificadas in vitro y luego microinyectadas en blastocistos, la modificación genética es transmitida por un ratón quimérico.

Por transferencia nuclear: Las células donantes de núcleo son primero transformadas y seleccionadas previo a la transferencia nuclear, todos los animales que nacen son transgénicos y todos los animales transmiten el transgen a la descendencia. Características: similares a consanguíneas. Obtención por manipulación directa del genoma. Aplicaciones: genética del desarrollo, obtención de modelos de enfermedades humanas y animales de origen genético

Knockout: básicamente se trata de una cepa coisogénica, con la excepción de que la mutación que poseen no es espontánea, sino dirigida, eliminando el gen de interés por manipulación genética. Tradicionalmente, los ratones knockout se generan mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias. Para ello se transfiere un gen (que difiere del original en que se le ha mutado para suprimir su actividad) a células madre provenientes de un blastocisto de ratón, luego algunas de estas células se inoculan a blastocistos que son transplantados a hembras pseudopreñadas. El proceso lleva varias etapas hasta que solamente la secuencia mutada que

es inoperante está presente. Estos ratones han tenido múltiples aplicaciones para el estudio de mecanismos de enfermedades humanas y en farmacología.

Knockin: es igual al knockout, pero no se elimina un gen determinado, sino que es reemplazado por uno nuevo.

No consanguíneas (outbred stock o exocriadas): Los animales exogámicos (stocks) se han utilizado ampliamente en la investigación biomédica. Las poblaciones fundadoras deben ser lo suficientemente grandes para asegurar la heterogeneidad de las colonias a largo plazo. Estos animales son los que mejor representan la variabilidad genética de una población humana, por lo que son muy utilizados en toxicología y farmacología. Hay que destacar que estos animales no son definidos genéticamente y poseen amplio vigor híbrido. Son colonias con amplia dispersión genética a lo largo del tiempo. Nunca se cruzan entre hermanos.

Características: heterocigosis, genotipo indefinido.

Debido a la falta de homogeneidad genética, estos grupos de animales se deben nombrar como *grupos* (stocks) o *colonias* y no como líneas (o cepas). Por la misma razón, no existe una nomenclatura oficial sobre estos animales; los últimos reglamentos acerca de su nombramiento son de 1972 y no se aplican con uniformidad. Actualmente existen dos tendencias: 1) utilizar nombres con 2 a 6 letras en mayúscula y aclarar en el texto que se trata de animales exocriados (ratones SENCAR, NMRI o ratas WISTAR, LONG EVANS) y 2), usar un nombre compuesto,

colocando en primer lugar el código del laboratorio y, luego de dos puntos, el nombre del grupo (puede agregarse entre paréntesis el origen). Por ejemplo, Crl:CD-1(ICR)BR es el stock CD-1 (de origen ICR) criado en el Charles River Laboratories, N:NIH (S) es un stock denominado NIH de origen Swiss (S) criado en el NIH (N), Crl:(LE)BR y Crl:(WI)BR son las ratas Long Evans y Wistar, respectivamente, criadas en el Charles River Laboratories.

Animales libres de patógenos específicos: son animales que están libres de microorganismos y parásitos específicos, pero no necesariamente de otros no especificados. Se mantienen en instalaciones bajo barreras sanitarias en estanterías ventiladas con aire filtrado y todo el material, comida y agua utilizado es estéril.

Animales axénicos o germ free: son animales que no presentan ningún tipo de microorganismo en la piel, ni poseen flora intestinal, demostrable por métodos conocidos. Son «animales estériles» y se mantienen aislados en equipos especiales denominados aisladores.

Animales gnotobioticos: Son obtenidos por cesárea aséptica, se desarrollan y permanecen siempre en aisladores. Con flora microbiana perfectamente conocida (en el estado actual de las técnicas de control).

Animales convencionales: Son animales con su microbiota intestinal normal mantenidos sin ningún proceso especial en instalaciones o sistemas denominados «abiertos», es decir, bajo barreras sanitarias no absolutas, libre de agentes zoonóticos.

Bibliografía

- Annual Statistics of Scientific Procedures on Living Animals Great Britain 2021 <https://www.gov.uk/government/statistics/statistics-of-scientific-procedures-on-living-animals-great-britain-2021>
- Benavides F, Guénet JL (2003): Manual de Genética de Roedores de Laboratorio. Principios básicos y aplicaciones. 312 pp. Ed: Universidad de Alcalá de Henares y Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL). ISBN: 84-8138-584-0
- Chia R, Festing M (2005): The origins and uses of mouse outbred stocks. *Nature Genetics* 37 (11): 1181-1186)
- Dutta S, Sengupta P (2016): Men and mice: Relating their ages. *Life Sciences* 152 (2016) 244-248
- Felmer R, (2004): Animales transgénicos: pasado, presente y futuro *Arch. Med. Vet.*, Vol. XXXVI N° 2, p. 105-117
- Gomez de Macedo Braga, L (2010): O animal como um modelo experimental. En: *Animais na pesquisa e no ensino: aspectos éticos e técnicos*. Pag 171- 186 Ed: Gonçalves Dos Santos Feijo A, Gomez de Macedo Braga, L, Condessa Pitrez P. ISBN : 978-85-7430-928-6
- National Research Council, (2017): Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio: Octava edición (edición en español). Ediciones Universidad Católica de Chile. 228 pp. ISBN978-956-14-2108-0
- Zuñiga J, Orellana J, (2016): Ciencia y tecnología en experimentación y protección animal formación avanzada de postgrado. Ed: Alcalá de Henares: Universidad de Alcalá; Madrid: Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio SECAL 971 pp. ISBN: 9788416599936

Sitios web

<https://geneticabioterio.wordpress.com/animestandarizados>

Capítulo IV.

Animales de laboratorio más utilizados

Ratón

Taxonomía

Clase: Mammalia
Orden: Rodentia
Familia: Muridae
Género: *Mus*
Especie: *musculus*

Generalidades

El ratón es el animal de laboratorio más utilizado en las pruebas de diagnóstico e investigación. Para la medicina experimental, el ratón es un organismo modelo que ofrece muchas ventajas con respecto a otros modelos genéticos como son la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, el nemátodo *Caenorhabditis elegans* e incluso la rata (*Rattus norvegicus*). Algunas de estas ventajas se listan a continuación (Benavides, 2005):

1. Al tratarse de un mamífero, gran parte de sus procesos bioquímicos son similares a los del hombre.
2. Tienen un tiempo generacional corto, son prolíficos y se adaptan fácilmente a la vida en los bioterios, lo que permite controlar las variables ambientales en las experimentaciones.
3. Desde el punto de vista genético, junto con el hombre es de las especies de mamífero mejor estudiadas. La gran mayoría de los genes humanos se encuentran en forma similar en el ratón; humanos y ratones poseen 3.1 billones de pares de bases y el 85 % es idéntico en ambos.
4. Se han generado una gran cantidad de líneas genéticamente definidas, como las consanguíneas y congénicas, además de cientos de mutaciones y un gran número de rearrreglos cromosómicos disponibles.
5. Es el único animal que posee sistemas de cultivo de células embrionarias pluripotenciales (células ES) eficientes, lo que permite la realización de mutaciones dirigidas (ratones KO constitutivos y condicionales).
6. El pequeño tamaño corporal permite su mantenimiento en forma eficiente y económica, pero dificulta la administración de drogas, y la colecta de líquidos corporales, así como también las técnicas quirúrgicas.
7. Finalmente, el trabajo acumulado durante un siglo de investigaciones ha resultado en una inmensa cantidad de documentación sobre los fenotipos mutantes, las características de las líneas, los mapas genéticos y la secuencia completa del genoma.

Origen e historia

El ratón doméstico (*Mus musculus*) tiene una amplia distribución mundial y se encuentra asociado al hábitat humano.

Todas las cepas de ratones de laboratorio existentes derivan de una cría selectiva del *Mus musculus* tipo silvestre, práctica que iniciaron los científicos a fines del siglo XIX. La cría de ratones por los biólogos condujo a una amplia variabilidad genética, lo que despertó el interés para emplearlo como animal de

laboratorio. La siguiente cronología lista de manera somera dichos hallazgos:

1909	Clarence Little obtuvo ratones con diferente color de pelaje: dilute (D), brown (B) y non-agutí (A); creando así la primera cepa endocriada reconocida (DBA).
1929	«Jackson Memorial Laboratory» se establece como centro de estudio de genética de mamíferos (Creado por Clarence Little).
1960	Se desarrolla el ratón <i>nude</i> , no posee timo funcional (inmunodeficiente) y fenotípicamente sin pelo. Surge el diseño de <i>biotérios en barrera</i> con control ambiental (SPF).
1963	Surge la Guía para uso de animales de laboratorio del National Institutes of Health (NIH)
1980	Surge el desarrollo de transgénicos y <i>knockouts</i> .

Comienza la educación formal por parte de la Federation of European Laboratory Animal Science Association (Felasa), y la creación de categorías: A, B, C, D para acreditar a quienes trabajan con animales.

Biología

El ratón doméstico es una especie cosmopolita, comensal del hombre. Se adapta ampliamente a una gran variedad de condiciones ambientales, desde zonas muy frías hasta regiones tropicales. En general las especies prefieren lugares más secos que

húmedos. Es de hábitos nocturnos, sociales y su comportamiento está influenciado por feromonas. Posee un agudo sentido de la audición, pueden oír desde 2 kHz a 100 kHz, con la mayor sensibilidad entre 15-50 kHz (Fig. 1) (Pritchett, 2011). Por ejemplo, cuando la hembra con cría sale del nido, sus crías emiten sonidos ultrasónicos que inmediatamente son percibidos por la madre. También son muy sensibles a los ruidos bruscos del ambiente. Algunos equipos de laboratorio emiten sonidos en estas frecuencias por lo que hay que tener cuidado con los equipos que se utilizan en los lugares en que están alojados los ratones (Jennings, 1998).

Su sentido del olfato está muy desarrollado, no solo para detectar comida y depredadores, sino también para percibir un orden social (Nevison, 1999). Su visión muy pobre; la retina posee pocos conos, y por lo tanto no pueden percibir los colores. Como roedor nocturno, a menudo no se considera que los ratones dependan de su sistema visual, sino que se basan en señales olfativas, táctiles y auditivas para localizar comida, interactuar con sus congéneres y evitar la depredación (Peirson, 2018). Poseen una glándula con forma de herradura en la órbita del ojo llamada glándula harderiana, cuando el ratón está estresado excreta una sustancia amarillada (porfirina) en la zona periocular, fácilmente detectable en los ratones albinos.

Su sistema social depende de la densidad de población, viven en grandes colonias y el rango social está bien definido.

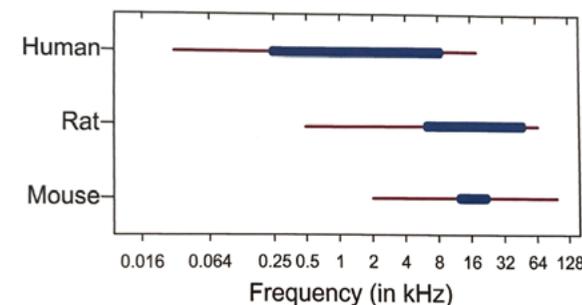


Fig. 1: Comparación de rangos de audición en ratones, ratas y humanos. Las líneas finas indican el rango de audición y las gruesas los picos de sensibilidad en c/u (adaptado de Pritchett, 2011)

Generalmente son dóciles, a excepción de algunas cepas exocriadas que mantienen su agresividad, al igual que sus antecesores salvajes.

Por su pequeño tamaño corporal son muy susceptibles a cambios ambientales, aún pequeños cambios de temperatura (2-3 °C) pueden afectar su temperatura corporal y modificar su fisiología.

Son omnívoros y el bazo del macho es mayor que el de la hembra.

El tamaño del ratón adulto varía entre 12 a 15 cm desde la punta de la nariz a la punta de la cola, y con un peso aproximado de 30 g, el largo de la cola es igual al largo del cuerpo. Las crías al nacer tienen un peso aproximado de 1 a 2 g y ganan rápidamente peso durante la lactancia. El tamaño del cuerpo del adulto varía de acuerdo a variables intrínsecas (genotipo, sexo y edad) y extrínsecas (dieta, número de ratones por caja y temperatura ambiental).

Muchos factores ambientales y genéticos influyen sobre la longevidad del ratón, entre estos factores se encuentra la dieta, la densidad animal por caja, las infecciones subclínicas, los métodos de apareamiento, la predisposición genética a tumores, la cepa, el sexo y la presencia o ausencia de genes mutantes deletéreos. El promedio de vida está influido por muchos factores genéticos y ambientales, tales como la dieta, número de animales por caja, infecciones, cepa, etc. En el caso de ratones de cepas de corta vida esta puede ser de 5-16 meses mientras que los de cepas de larga vida sobreviven hasta 24-36 meses

(Kaliste, 2007). En general, los ratones híbridos, producto del cruzamiento entre dos cepas puras, viven más que los parentales.

En lo que refiere a reproducción, tienen una vida útil de 10 a 12 meses y se obtienen de 10 a 12 camadas, con un número de crías que depende de la cepa.

Comportamiento

El ratón de laboratorio es un animal sociable y se mantiene, usualmente, en grupos sin ningún inconveniente, estos grupos deben formarse al momento del destete. Los machos de algunas cepas comienzan a mostrar su agresividad entre la séptima y décima semana de edad, aún entre grupos que se hayan establecido al destete. En grupos de machos, existe un ratón dominante que puede ser muy agresivo; las hembras generalmente no pelean, incluso cuando se hayan agrupado siendo ya adultas.

Normalmente dividen su caja en áreas específicas para dormir, comer, orinar y defecar. Los ratones de laboratorio ocasionalmente sacan la comida del comedero para almacenarla en una esquina de la caja. El acto de comer es cíclico, con un pico máximo durante el período de oscuridad. La cantidad de agua consumida varía considerablemente entre las diferentes cepas endocriadas, y algunas pueden desarrollar polidipsia (necesidad exagerada de beber) debido a alguna patología.

Las hembras parturientas construyen un nido y permanecen mucho tiempo cerca de este o sobre las crías. El canibalismo de los ratones jóvenes puede ser un serio problema en colonias endocriadas. El manejo de los recién nacidos debe hacerse manipulando de manera suave y tranquila, y devolver la camada al nido lo más pronto posible.

Usos en el laboratorio

Como ya se mencionó, el ratón es el animal más popular para su uso en el laboratorio por su pequeño tamaño, fácil manejo y bajo costo de mantenimiento comparado con especies de mayor tamaño. Su vida relativamente corta, lo hace idóneo para su uso en ensayos crónicos de toxicología, neurología, microbiología, virología, gerontología, oncología, parasitología, farmacología, inmunología, embriología, teratología y en estudios genéticos, entre otros.

Microambiente

Los ratones que se utilizan con propósitos experimentales se alojan en cajas de plástico o policarbonato provistas de tapas rejilla de acero inoxidable.

En el caso de los ratones adultos (con un peso aproximado de 25 g) se requiere una superficie mínima de 90 cm² por animal, superficie que debe aumentar-se hasta 200 cm² en el caso de las hembras lactantes

con la camada. En todos los casos la altura de las paredes de la caja no debe ser inferior a 15 cm (Tabla 1, anexo III).

Las camas deben estar libres de polvo, absorbentes, atóxicas, no producir alergias y ser esterilizables. La limpieza y desinfección de las cajas se debe hacer como mínimo una vez por semana, dependiendo de la cepa, número de animales por caja y de la ventilación del ambiente.

El agua puede administrarse en mamaderas o en bebederos automáticos. Se puede acidificar con ácido clorhídrico hasta llevarlo a un pH entre 2,3-2,8; hipercloración de 3 a 5 ppm de Cl-libre. También puede esterilizarse por medio de autoclave o por filtración.

El alimento debe administrarse *ad libitum*, generalmente con preparados comerciales. Para los animales SPF, axénicos y gnotobióticos (ver capítulo III) el alimento debe ser estéril, la esterilización se puede hacer por medio de radiación o autoclave, en este último caso el alimento se debe reforzar, previo un análisis de composición.

Un ratón adulto consume a diario aproximadamente 12 g de alimento por cada 100 g de peso corporal, pero al igual que el agua consumida, varía en función de la temperatura ambiental y humedad relativa, sequedad y calidad del alimento, estado reproductivo y sanitario, etc.

Macroambiente

La temperatura de las habitaciones debe mantenerse entre los 20 °C y los 25 °C, siendo la más adecuada entre los 22 °C +/- 1°C y la humedad relativa entre 40 y 70 %, cuando la humedad es inferior a estos parámetros se puede producir, (al igual que en la rata), el síndrome de la cola en anillo o *ring tail* (Fig. 8). Los roedores en general tienen menor resistencia a las altas temperaturas ya que disipan el calor con dificultad por carecer de glándulas sudoríparas, no jadean y tienen el cuerpo cubierto de pelos. La pérdida de calor se efectúa por la cola, las orejas, y los testículos que se encuentran fuera de la cavidad abdominal.

La ventilación de los ambientes donde se localizan los ratones es importante para controlar la humedad, el calor y la concentración de gases tóxicos. Se deben hacer entre 10 y 14 recambios de aire por hora.

La iluminación es importante para la regulación del ciclo estral y reproductivo. Se recomienda 12 hs de luz / 12 hs de oscuridad, con luz fluorescente de 325 lux de intensidad y en albinos de 50 lux. En el caso de animales albinos es necesario agregar enriquecimiento que les permita regular su exposición a la luz.

Programa reproductivo

El programa reproductivo debe establecerse teniendo en cuenta básicamente: la necesidad de animales, el espacio disponible, la fecundidad de la cepa, y el esquema de consanguinidad de los animales a cruzar.

La madurez sexual del ratón comienza entre las 7 y 9 semanas de vida. La hembra es poliéstrica continua y se observa un tapón mucoso vaginal al quedar preñada (Fig. 3). Presentan un período gestacional de entre 18 a 20 días. Tras el parto, entre las 14-28 hs se produce un estro fértil, por lo que puede utilizarse el estro postparto para programar una nueva camada, teniendo en cuenta que la lactancia y gestación simultáneas puede retrasar entre 3 y 5 días la implantación del embrión.

Al nacer, el ratón pesa entre 1 y 2 g. Nace con los ojos y oídos cerrados, sin pelos y es muy activo. Al tercer día comienza a notársele el pelo, para estar completamente cubierto a los 10 días (Fig. 2). A los 12 días comienza a abrir los ojos y el conducto auditivo externo, entre el decimotercer y decimocuarto día empieza a ingerir alimento sólido y agua del bebedero.

Generalmente se los desteta a los 21 días de edad con un peso de 10 a 12 g. Cuando no se ha utilizado el estro posparto las hembras adultas comienzan a ciclar a los 5 días posdestete.

Sistemas reproductivos

Los sistemas reproductivos más empleados en las colonias de fundación y producción son:

1. Sistema monogámico: se realiza colocando un macho y una hembra en una misma caja. Este sistema se utiliza en colonia de fundación para el mantenimiento permanente del mismo. Las crías que se obtienen se destetan a los 21 días, antes de que se produzca el nuevo nacimiento. Con este sistema, en el que se aprovecha el celo postparto, se logra un mayor número de camadas, a la vez que permite un correcto control y evaluación de la producción de cada hembra. Como desventaja hay que señalar el elevado número de machos, el desgaste prematuro de la hembra, se requiere mayor cantidad de espacio y la mano de obra utilizada es mayor.
2. Sistema poligámico: se hace apareando un macho con 2 a 3 hembras. Antes del parto las hembras se llevan a cajas individuales, lo que naturalmente impide aprovechar el celo postparto. Como consecuencia, con este sistema la hembra se desgasta menos, lo que se traduce en mayor viabilidad y mayor tamaño de crías destetadas. Como desventaja hay que señalar el menor número de camadas por hembra, un mayor trabajo a desarrollar en cada caja y finalmente el agotamiento de los machos.

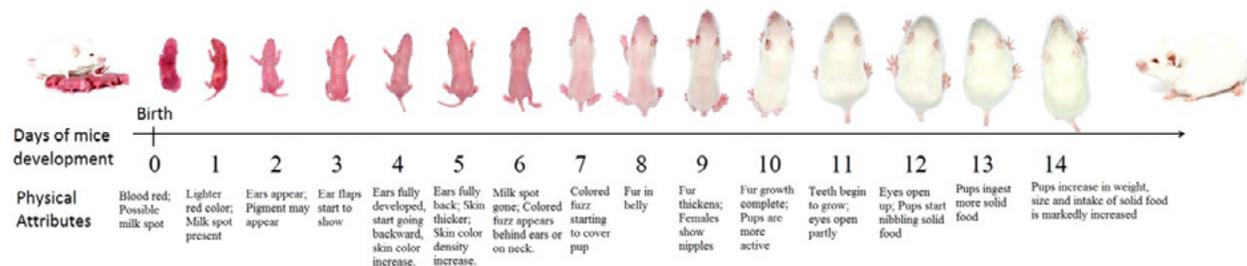


Fig. 2: Primeras 2 semanas de vida del ratón (adaptado de Dutta, 2016)

Ciclo estral

Tiene una duración de 4 a 5 días, en tanto que el celo propiamente dicho dura aproximadamente 12 horas. Durante la lactancia se interrumpe la periodicidad ovárica. Cuando se colocan las hembras en grupos homosexuales, puede darse en todas ellas un período de anestro continuo, que se interrumpe cuando se introduce un macho en el grupo o, simplemente, mediante su olor, utilizando las camas extraídas de las cajas de los machos. Aproximadamente 72 hs después se produce una cierta sincronización del celo, hecho que recibe la denominación de «Efecto Whitten».

Las hembras no lactantes tienen un período de gestación que oscila entre 19 y 21 días, en las hembras lactantes aumenta entre 3 a 10 días en función del tamaño de la camada. En algunas cepas las hembras fecundadas por un macho no deben tomar contacto físico o exponerse al olor de otro macho, al menos en las primeras 48 horas de gestación, si esto ocurre, se produce la reabsorción embrionaria, proceso que se denomina «Efecto Bruce».

Estos efectos del macho sobre los ciclos son inducidos por una feromona andrógeno-dependiente que se agrega a la orina dentro de la vejiga y también durante la salida al exterior, en este caso por la secreción de las glándulas prepuciales (Greco, 2020).

El diagnóstico de gestación se realiza por la presencia de espermatozoides en frotis vaginales (en el capítulo V se detalla cómo realizar los frotis vaginales),

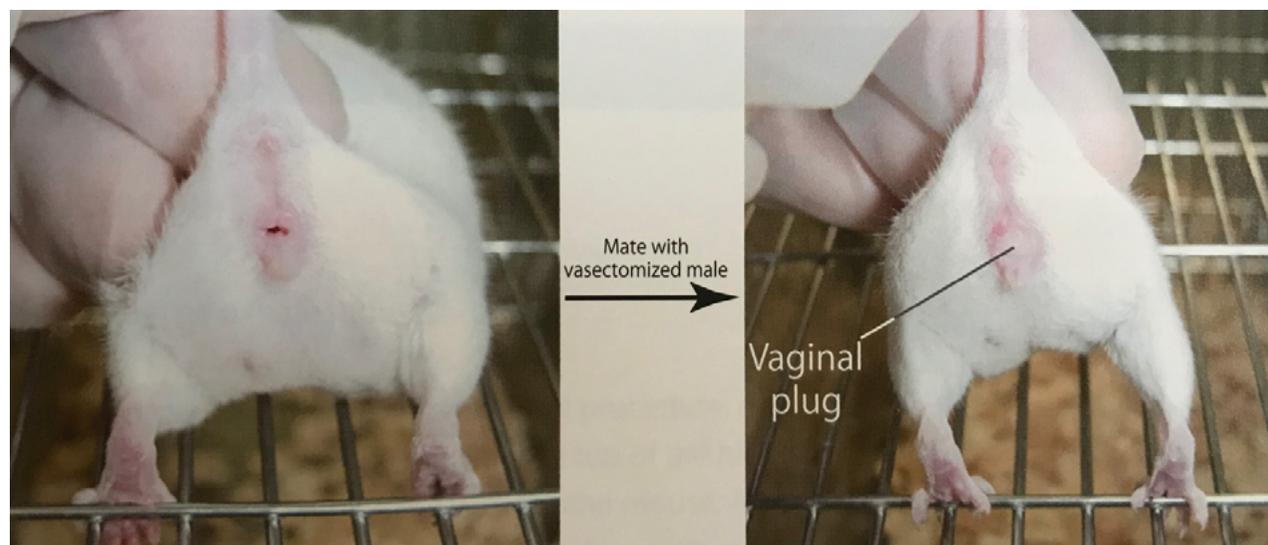


Fig. 3: Tapón vaginal en hembra preñada: Izquierda vagina en proestro, derecha tapón vaginal. (adaptado de Nakagata, 2015)

como así también por la presencia de un tapón vaginal formado por el semen gelificado (Fig. 3); estos son indicadores de que se ha producido la cópula en las 24 horas precedentes.

El tamaño de la camada varía dependiendo de la cepa, la edad de la madre, etc., pero siempre la primera camada es más reducida, siendo las más numerosas entre el segundo y octavo parto.

Manejo

Los ratones jóvenes y adultos se sujetan y se levantan tomándolos por la base de la cola o por el cuerpo con los dedos o con pinzas pequeñas, teniendo especial cuidado con las cepas agresivas ya que son de movimientos rápidos y pueden morder.

Sujeción

Tome al ratón por la base de la cola, sáquelo de la jaula y apóyelo sobre una superficie rugosa o una parrilla contra la que pueda ejercer resistencia (por ejemplo, sobre la tapa de la jaula). Sin soltarlo, tome en forma rápida, suave y firmemente, la piel del cuello con los dedos índice y pulgar y luego sujete la cola entre el dedo meñique y la palma de la mano. Levante el animal (Fig. 4) de esta forma el animal queda inmovilizado. Otra forma que actualmente se utiliza para manipular ratones, en especial cuando se

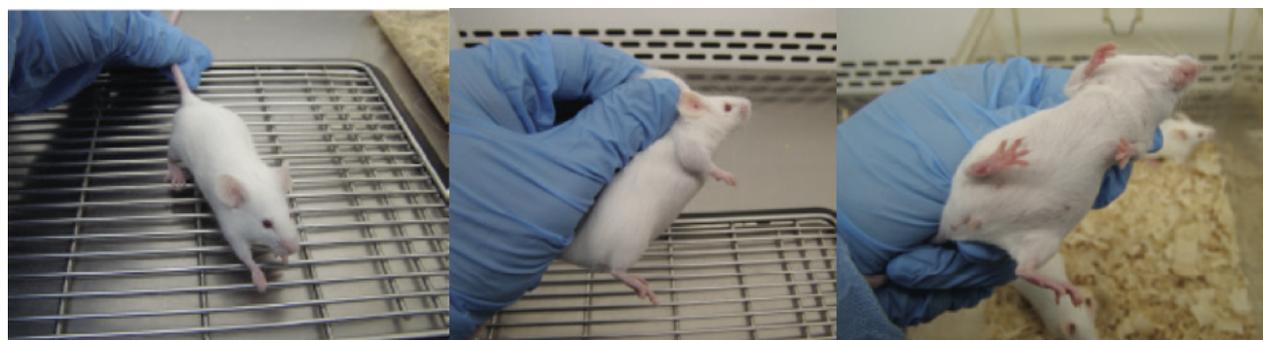


Fig. 4: Método de sujeción en ratón (adaptado de Mourelle, 2013)

realiza el cambio de cajas, es por medio de un «túnel de contención» de los utilizados para enriquecimiento o formando una copa con la palma de la mano para de esta forma evitar sujetarlo de la cola que es más estresante (Fig. 5)

Identificación

Existe una gran variedad de métodos para la identificación permanentes y los temporales. Los métodos de identificación permanente incluyen muescas en orejas, tatuajes en la cola, etc. La identificación temporaria se puede alcanzar tiñendo la piel de los ratones albinos, cortando el pelo o haciendo marcas en la cola con tinta indeleble. Los dos primeros métodos permiten la identificación por una o dos semanas y las marcas de tinta desaparecen en uno o dos días. Existen códigos de numeración tanto para las muescas en orejas como para el marcado con tinta indeleble (Tabla 2, anexo III).

Sexado

Usando la técnica de sujeción adecuada, se puede verificar el sexo midiendo la distancia anogenital; en el macho esta distancia es mayor que en la hembra (Fig. 6). Los testículos, son evidentes en animales púberes y adultos (o a partir de la pubertad).

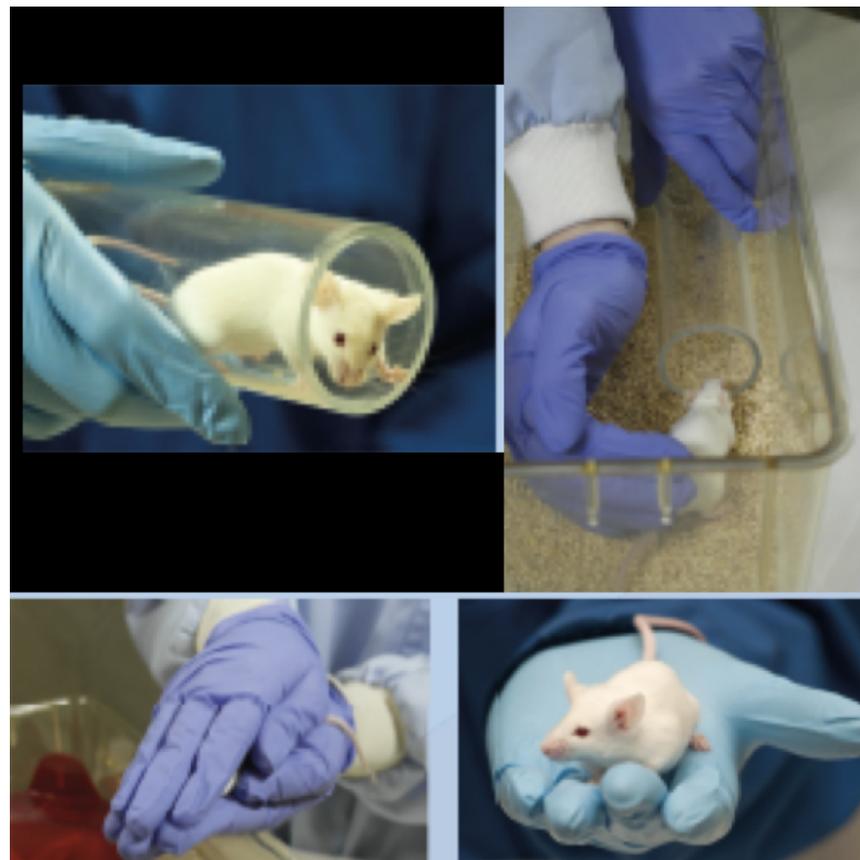


Fig. 5: Nuevo método de sujeción de ratón (adaptado de <https://www.nc3rs.org.uk/mouse-handling-poster>)

Rata

Taxonomía:

Clase: Mammalia
Orden: Rodentia
Familia: Muridae
Género: *Rattus*
Especie: *novergicus*
Especie: *rattus*

Origen

La rata de laboratorio surge de la domesticación de la rata noruega especie cosmopolita. Fue la primera especie de mamíferos domesticada con propósitos científicos (Weihe, 1987). Algunos ejemplos de uso temprano en investigación se listan a continuación:

- 1856 Philipeaux (Francia) estudia ratas a las que se les extrajo la médula adrenal.
- 1877 En Alemania se utilizaron ratas albinas y salvajes para experimentación.
- 1890 Se exportan los primeros stocks de ratas desde Suiza a Estados Unidos y son utilizadas para estudios de neuroanatomía en la Universidad de Chicago.
- 1906 Parte de las ratas provenientes de Suiza pasan al Instituto Wistar de Filadelfia, donde el fisiólogo Donaldson estandariza las colonias y surge la cepa Wistar. Comienza en este instituto la endocria de ratas. Casi el 40 % de las cepas endocriadas actuales derivan de la cepa Wistar.



Fig. 6: Esquema de identificación sexo en ratón y rata (adaptado de AALAS, 2011)

Generalidades y biología

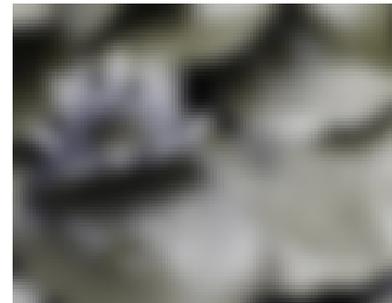
La rata tiene muchas particularidades que le favorecen como animal de laboratorio. Está perfectamente caracterizada desde el punto de vista anatómico, fisiológico y genético. Se reproduce muy bien por exocría y endocría por lo que existen muchas cepas *inbred* y *outbred*. Algunas de las *outbred* son: Sprague Dawley (SD), Wistar (WI), Long Evans (LE). Las cepas *inbred* más utilizadas incluyen: Fisher 344 (F344), Brown Norway (BN), Lewis (L), y Wistar-Furth (WF).

Son animales muy adaptables, fáciles de cuidar y manejar. Es posible producirlas libres de patógenos (SPF) con lo cual se reduce la principal variable no controlada que invalida la investigación con animales.

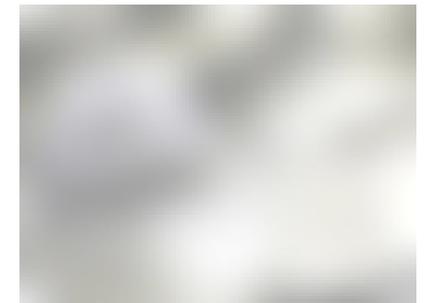
Son animales de hábitos nocturnos y curiosos. Los sentidos del olfato y audición están muy desarrollados, la rata puede oír altas frecuencias igual que el ratón (Fig. 1). Presenta una visión pobre (Fig. 7). Es ciega a la longitud de onda del rojo, no tiene visión en colores, pero es buena en la zona de baja longitud de onda. Posee receptores táctiles desarrollados sobre la cabeza, alrededor del hocico, en las patas y sobre la cola. La cola es utilizada para la orientación sobre el terreno y equilibrio durante el salto; sirve como principal órgano de regulación de temperatura. La circulación sanguínea de la cola aumenta cuando el animal necesita eliminar calor de su cuerpo. El promedio del peso de un macho adulto es de 250 a 520 g, las hembras son más chicas y tienen una vida de 2,5 a 3,5 años; estos parámetros



Vision Humana



Ratas normalmente pigmentadas tienen una visión dicromática borrosa con un poco de color.



Ratas albinas pueden ver un mundo muy borroso y deslumbrado por la luz

Fig. 7: Comparación de la visión de la rata con el humano (Adaptado de <http://www.ratbehavior.org/RatVision.htm#NormalRatVision>)

dependen en gran medida de la cepa. En grupos de hembras o machos raramente se observa agresividad.

Al igual que los ratones presentan glándulas harderianas en la órbita del ojo, cuando la rata está estresada dichas glándulas secretan porfirina, la secreción sirve como indicador del estado sanitario del animal.

No poseen vesícula biliar, tiene el estómago dividido en una zona no-glandular y otra glandular y no poseen el reflejo del vómito.

Los machos poseen una distancia anogenital mayor que las hembras. Son poliéstricas continuas, con celo postparto. Al nacer pesan aproximadamente 5 g, no tienen pelo, el conducto auditivo y los ojos están cerrados. El destete se puede realizar a los 21 días de nacido, con un peso aproximado de 40 a 50 g, edad en que las crías sobreviven sin dificultad.

Microambiente

Las cajas o jaulas deben ser de material plástico con tapas de acero inoxidable o alambre galvanizado y la altura de la caja debe permitir todas las posturas de la rata inclusive el pararse sobre su tren posterior. Un animal adulto necesita una superficie de 259 cm², y en una hembra con cría el espacio debe ser de 1000 cm² (Tabla 1, anexo III). Dado que la cola es un órgano termorregulador, si las ratas se encuentran hacinadas y la temperatura ambiental es elevada, se producen fallos en el sistema termorregulador del animal, produciéndose la *cola en anillo* (Fig. 8).

Para las camas se deben utilizar materiales absorbentes, libres de polvo, atóxicos, y hasta donde sea posible que no produzcan alergias, que no tiñan a los animales y que sean esterilizables. La alimentación y el agua se deben administrar *ad libitum*; el agua, se puede administrar con bebederos automáticos o maderas, en lo posible se debe esterilizar, acidificar o hipoclorar al igual que para los ratones.

Macroambiente

El macroambiente de la rata es muy similar al del ratón. La temperatura adecuada es de 18 a 24 °C, el ideal es 22 °C. La ventilación es importante debiendo hacer de 10 a 15 cambios de aire por hora.

Los ruidos las afectan menos que a los ratones. La iluminación es importante entre otras cosas para la regulación del ciclo estral y reproductivo, con régimen de 12 horas de luz y 12 de oscuridad.

Programa reproductivo

Poseen un ciclo estral de 4 a 5 días, el celo dura 12 hs aproximadamente y se produce generalmente durante la noche. Se utilizan los mismos sistemas de cría que en el ratón:

- **Sistema Monogámico:** este tipo de sistema se utiliza en el stock de fundación. Se realiza



Fig. 8: Síndrome de cola anillada (adaptado de: <https://www.humane-endpoints.info/es/rata/factores-fisicos>)

colocando un macho y una hembra en una misma caja de forma continua separando las crías antes de que nazca la siguiente camada. Con este sistema, en el que se aprovecha el celo postparto, se logra un mayor número de camadas, a la vez que permite un correcto control y evaluación de la producción de cada hembra. Como desventaja hay que señalar el elevado número de machos, el desgaste prematuro de la hembra, se requiere mayor cantidad de jaulas y espacio, y la mano de obra utilizada es mayor.

- **Sistema Poligámico:** se realiza apareando un macho con 2 a 3 hembras. Antes del parto las hembras se llevan a cajas individuales, lo que naturalmente impide aprovechar el celo postparto. Como consecuencia, con este sistema la hembra se desgasta menos, lo que se traduce en mayor viabilidad y mayor tamaño de crías destetadas. Como desventaja hay que señalar el menor número de camadas por hembra, un mayor trabajo a desarrollar en cada caja y finalmente el agotamiento de los machos.

Presentan al igual que los ratones el *efecto Whitten* aunque con menor intensidad. Esto es: cuando se colocan las hembras en grupos, puede darse en todas ellas un período de anestro continuo, que se interrumpe cuando se introduce un macho en el grupo, 72 hs después se produce una cierta sincronización del celo. En cambio, no presentan el «Efecto Bruce» que sí se da en algunas cepas de ratones.

La gestación dura de 20 a 22 días, pero sí se utiliza el celo postparto para una nueva preñez el tiempo de gestación se alarga, ya que la lactancia provoca que la implantación de los embriones se retrase de 5 a 7 días. El tamaño de la camada depende de la cepa, pero generalmente es de 6 a 12 crías.

Manejo

Sujeción

La rata no es un animal agresivo, aun cuando se la someta a tratamientos continuos o se manipule por largos períodos.

Los ejemplares adultos no deben levantarse por la cola, ya que esto les causa estrés y ocasional desprendimiento de la capa córnea de la piel de esa región, además cómo se mencionó la cola es un órgano importante para la rata.

Existen diferentes formas de sujetar la rata:

1. Apoyar la palma de la mano sobre el lomo del animal, coloque los dedos índice y medio a ambos lados de la mandíbula, de forma que la cabeza de la rata quede entre dichos dedos impidiendo su movimiento. Con la otra mano tomar la parte posterior del cuerpo. Así puede levantarla sujetándola firmemente (Fig. 9).



Fig. 9: Método de sujeción de rata (adaptado de Mourelle, 2013)

2. Para sujetar al animal con una sola mano hay que tomarlo por la piel del cuello con los dedos pulgar e índice por detrás de las orejas y con los otros dedos de su mano sujetar la piel de todo el lomo de la rata. Levante al animal, sujetándolo firmemente (Fig. 10).

Cuando se manipulan hembras con camada siempre hay que esperar que la madre salga del nido para intervenir con la camada. La madre debe de sacarse de la caja cuando se manejan los neonatos, estos se deben manipular de forma rápida y con cuidado.

Sexado

Mediante el uso de alguna de las técnicas de sujeción mencionadas, se puede realizar el sexado midiendo la distancia anogenital, (que en el macho es mayor que la hembra) o bien observar la presencia de testículos ya evidentes desde edades tempranas (Fig. 6).

Identificación o marcado

Se utilizan las mismas técnicas que en ratón. Existe un código para la numeración de las ratas con marcas en la oreja mediante un sacabocado (Fig. 11), estas marcas se deben realizar al momento del destete de las ratas, más tarde no es aconsejable ya que

el cartílago de la oreja se torna grueso y se produce mucho dolor al animal.

Cobayo

Taxonomía

Clase: Mammalia
Orden: Rodentia
Suborden: Hystricomorpha
Familia: Caviidae
Género: *Cavia*
Especie: *porcellus*

Orígenes

De origen sudamericano conocido como apereá, domesticado por los Incas y llevado a Europa por los españoles. El nombre científico de la especie salvaje es *Cavia aperea*, actualmente conocida como *Cavia porcellus* (Zuñiga, 2002).

Fue introducido en Europa por los españoles en la mitad del siglo XVII, como mascota. No se conoce con exactitud la fecha cierta en que se utilizó por primera vez como animal de experimentación, pero se sabe que en 1780 Lavoisier lo utilizó para medir la producción de calor metabólico (Melechon, 2018).



Fig. 10: Método de sujeción de la rata con una sola mano (adaptado de Mourelle, 2013)

En 1882 fueron utilizados en las investigaciones de Robert Koch respecto al *Mycobacterium tuberculosis* como causante de la tuberculosis (Cruz-Rodríguez, 2017); y en 1907 utilizando cobayos es descubierta la Vitamina C por Szent-Györgyi en 1927 (Bolet, 2004).

Biología general y comportamiento

En la naturaleza, son animales rápidos, no hacen cuevas, pero suelen vivir en refugios cavados por otros animales. Son dóciles y se adaptan rápidamente al régimen del laboratorio. Son animales sociables, pero los machos pueden ser agresivos. Cuando se sujetan o transportan hay que tener en cuenta que, a pesar de no morder y parecer no reactivos, son muy sensibles a los movimientos y asustadizos quedando estáticos durante 30 minutos o más (Wolfensohn 2013; Melechon 2018).

El largo del cuerpo incluyendo la cabeza es de 14 cm al nacer y 31 cm en los animales adultos. Los machos adultos pesan entre 900 a 1200 g y las hembras de 700 a 900 g. No presentan cola, tienen tres dedos en las patas traseras y 4 en las delanteras, en todas tienen garras. Desde el día del nacimiento comienzan a comer alimento sólido y a beber agua, aunque la lactancia dura 2 a 3 semanas. La longevidad es de entre 5 y 6 años, pero se puede acortar 2 años en las hembras reproductoras. Muestran ciclos de actividad y reposo que duran 2 a 3 horas, y no dependientes de los ciclos luz-oscuridad.

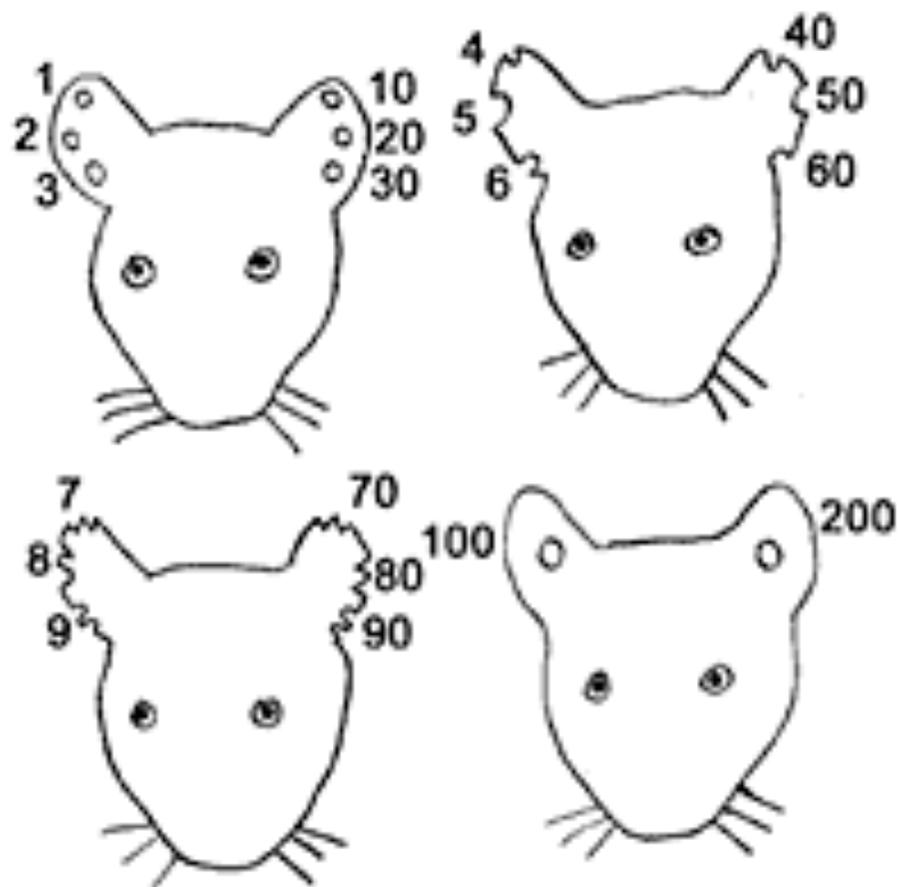


Fig. 11: Código de Identificación Mediante Muecas, a la derecha se muestra un sacabocado utilizado para realizar las marcas (adaptado de AALAS, 2011).

En los tipos silvestres el pelaje es largo y grisáceo o amarillado. Sin embargo, los cobayos domésticos tienen el pelo largo y fino (pueden presentar remolinos) y una gran variedad de colores.

Tienen gran cantidad de glándulas sebáceas en el dorso y alrededor del ano, su secreción sirve para marcar territorio. Tanto los machos como las hembras presentan un par de mamas inguinales.

Presentan el timo localizado en la región cervical, como es muy fácil removerlo quirúrgicamente son muy utilizados los animales atímicos para estudios inmunológicos. Estómago enteramente glandular, ciego muy grande ocupa el 60 % de la cavidad abdominal.

Son muy susceptibles a cambios en la flora microbiana entérica y pueden sufrir enterotoxemia (De Cubellis, 2013); por lo que se debe tener precaución cuando se administren antibióticos, especialmente orales.

Son animales muy tímidos de hábitos crepusculares y en general dejan sus moradas a la noche para buscar alimento. Comen una amplia variedad de vegetales (Melechon, 2018).

Viven en grupos con jerarquías sociales usualmente centradas alrededor de un macho dominante, en la naturaleza viven en pequeños grupos de 5 a 10 individuos. Los machos pelean vigorosamente, en particular en presencia de hembras en estro o cuando se tiene que establecer el rango social en un grupo. Es

frecuente que los animales de mayor edad muerdan, por lo común en las orejas, a los animales más jóvenes o subordinados (Wolfensohn 2013; Melechon 2018).

La vocalización parece jugar un papel importante en el comportamiento social de los cobayos. Se han registrado al menos 11 vocalizaciones diferentes, algunas de las cuales no son audibles para el humano.

En cuanto al alimento a ofrecerles, se debe proteger de contaminación y estar disponible ad libitum. Se les debe alimentar diariamente a una hora fija y asegurar el acceso a todos los individuos al alimento. Son muy susceptibles al déficit de vitamina C, que debe administrarse a diario en la comida o el agua (a una concentración de 100 mg/kg peso vivo) (Zuñiga, 2016).

Razas, cepas y genética

Se conocen tres razas principales (Wolfensohn, 2013):

1. *inglés*: de pelo corto (3 a 4 cm);
2. *peruano*: de pelo largo (hasta 40 cm);
3. *abisinio*: de pelo arremolinado, rizado, agrupados en mechones o en rosetas, el color de capa depende del genotipo, presentando 6 loci principales y otros menores:



Fig. 12: Método de sujeción del cobayo (gentileza de MsCs M Ricca y Tec C Mourelle <https://www.labanimalstraining.com>)

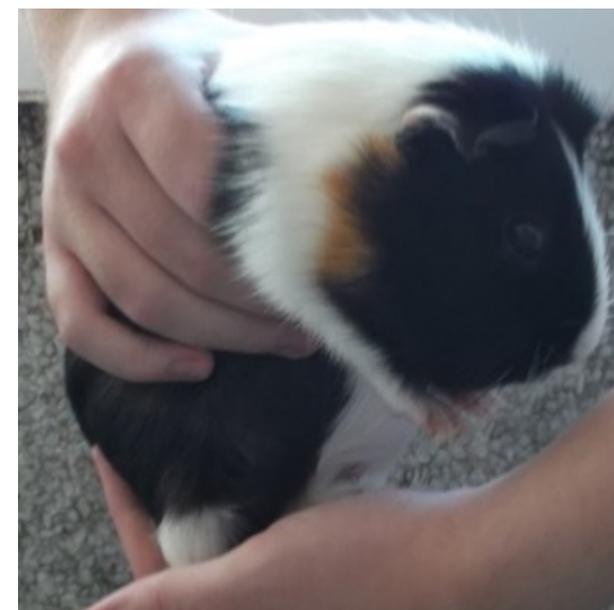


Fig. 13: Método de sujeción de hembra gestante (adaptado de Melechon, 2018)

- locus agutí;
- locus marrón;
- locus albino;
- falta de color
- ojos rosas, o
- manchas blancas.

Se han desarrollado un número de colonias cerradas, de stocks para ser usados como animales de experimentación. Existen cepas endocriadas ya desde 1915, pero solo dos cepas (la 2 y 13) son las más comúnmente usadas. El stock Dunkin-Harley fue establecido en 1926 y actualmente está distribuido por todo el mundo y se han desarrollado un gran número de sublíneas, tales como la Pirbright y la Jap-Hartley. Otras colonias genéticamente heterogéneas, tales como el stock multicolor del NHI se utiliza para infinidad de usos.

Usos en el laboratorio

Esta especie se usa en inmunología ya que presenta *células de Kurloff* que son un tipo especial de leucocitos, estas células tienen que ver con la defensa inmunológica del feto actuando como *natural killer*. Son utilizados para estudios de la respuesta inmune y su control genético y para estudios hormonales. También se los usa en estudios de shock anafiláctico y encefalomiелitis alérgica y para estudios del tracto respiratorio, ya que son muy sensibles a alérgenos y reacciones anafilácticas (Zuñiga, 2016).

También en estudios bioquímicos, toxicológicos, fisiológicos y farmacológicos. Se usan por su tamaño adecuado, además por ser buenos hospedadores de organismos causantes de enfermedades, como la micoplasma de la tuberculosis (*M tuberculosis*) (Wolfensohn, 2013).

Se los utiliza en estudios de otología ya que tienen una estructura auditiva similar a los humanos. Se puede identificar la sordera en los cobayos por los movimientos de las orejas en respuesta al ruido. También para el estudio del metabolismo del ácido ascórbico, ya que como se mencionó, al igual que el hombre, necesitan de vitamina C en su dieta.

Su suero se usa en test de fijación de complemento para diagnóstico de infecciones virales y bacterianas.

Por su gestación muy larga también se los estudian en reproducción y dosis letal 50.

Microambiente

Pueden mantenerse en una gran variedad de cajas incluyendo jaulas en el piso, estantes fijos, racks móviles con jaulas de metal o de plástico (Tabla 1, anexo III). Las jaulas en el piso pueden construirse con una gran variedad de materiales, desde ladrillos a bloques de concreto con división metálica. Las paredes deben ser de 40 cm de alto. Los pisos deben ser aislantes, fáciles de limpiar y desinfectar, deben mantenerse secos y evitar inundaciones. La principal desventaja de las jaulas en el piso es el mal aprovechamiento del



Fig. 14: Sexado de cobayo, a la derecha se observa un macho (gentileza de MsCs M Ricca y Tec C Mourelle <https://www.labanimalstraining.com>)

espacio, sin embargo, es una construcción barata y en general da buenos resultados.

Los animales adultos deben disponer de una superficie de 950 cm² por animal, que se debe aumentar a 1100 en caso de ser hembras con cría.

La cama puede ser de viruta de madera, tiras de papel absorbente o diversos productos vegetales, pero no debe ser palatable y debe ser abundante.

Los bebederos pueden ser del tipo de rata y ratón, pero dado que estos animales tienden a tomar agua con el alimento en la boca, este puede ser introducido dentro del bebedero y terminar taponando el pico, por lo que los bebederos deben controlarse de forma periódica.

El alimento se le administra *ad-libitum* en comederos tipo tolva, delante de la jaula, donde solo se pueda introducir la cabeza, ya que el cobayo tiende a defecar en ella si se le colocan en comederos convencionales dentro de su alojamiento. Normalmente consumen 6 g de ración por cada 100 g de peso del animal.

El cobayo requiere una dosis diaria de ácido ascórbico (vitamina C). Si los alimentos que se le están administrando no lo contienen, deberán añadirse. Se debe tener en cuenta que la actividad de esta vitamina si es administrada con la bebida disminuye un 50 % en 24 hs, por lo que si se opta por esta opción se deberá diariamente reponer el agua

con la vitamina (Wolfensohn 2013; Zuñiga 2016; Melechon 2018).

Macroambiente

Las temperaturas más adecuadas son aquellas comprendidas entre los 18 a 25 °C. La ventilación es de 8 a 20 recambios de aire por hora. Las altas temperaturas ambientales, sin la adecuada renovación de aire, predisponen a los animales a neumonía (Zuñiga, 2016). La humedad relativa más adecuada oscila, en función a la temperatura, del 30 al 70 %. Los cobayos son muy sensibles a los ruidos, al igual que las otras especies. Deben tener un período lumínico comprendido entre 12 a 16 horas por día (Wolfensohn 2013; Zuñiga 2016; Melechon 2018).

Manejo y reproducción

Sujeción

Los cobayos son animales muy tímidos y nerviosos. Cuando el operador se aproxima da vueltas en la caja, entra en pánico y esto dificulta su sujeción.

El animal debe sujetarse con ambas manos, una mano rodeará los hombros y la otra soportará el peso del tren posterior. Si se lo sujeta con los dedos pulgar e índice alrededor del cuello, el animal se

siente más relajado (Fig. 12). Hay que tener cuidado porque este animal a pesar de que rara vez muerde posee dientes muy largos. Cuando se sujetan hembras preñadas, debe hacerse delicadamente, y con una mano colocada bajo los cuartos traseros, para soportar el peso del vientre, para evitar que se produzca un desgarro del útero (Fig. 13) (Zuñiga 2016; Melechon 2018).

Sexado

Para el sexado se debe tomar el cobayo de la forma indicada en la figura 12. Posicionar la mano que se utilizó para sujetar la parte posterior de tal forma que el animal quede *sentado* sobre la palma de la mano y el dedo pulgar en la zona ventral. Colocar el dedo pulgar por encima de la zona genital y aplicando una presión hacia arriba se logra exponer el sexo del animal (Fig. 14).

La hembra es poliéstrica anual, con ovulación espontánea y sexualmente madura a los 4 – 5 meses, se debe preñar enseguida para evitar problemas de cadera ya que de lo contrario se sueldan los huesos de la cadera ocasionando problemas posteriores. Se utiliza sistema de harenes para la producción. La gestación puede llegar a ser de 75 días, el tiempo de gestación disminuye al aumentar el número de crías. En la hembra la membrana que recubre la vagina se abre cuando está en celo o para parir (Zuñiga, 2016).

Identificación

Puede realizarse mediante la colocación de una cavahana de plástico o metal (con un número o letra) en una oreja. Es importante que su colocación sea perfecta, para evitar que se caigan. Previamente desinfectar la oreja con un algodón con alcohol. También puede utilizarse un código similar al de ratas y ratones con perforaciones en las orejas, aunque no se recomienda ya que como los adultos tienden a morder las orejas de los demás cobayos pueden perderse estas marcas lo que modificaría el código de numeración. En los albinos se puede utilizar marcas con ácido pícrico en el lomo (Zuñiga, 2016).

Conejo

Taxonomía

Clase: Mammalia
Orden: Lagomorpha
Familia: Leporidae
Género: *Oryctolagus*
Especie: *cuniculus*

Origen

El conejo es un Lagomorfo que existe como tipo salvaje y doméstico. Se utiliza como productor de carne, piel, como animal de laboratorio y como mascota.

Es originario de la península Ibérica y de allí se extendió a distintas regiones del Mediterráneo y posteriormente hacia el oeste de Europa. En las colonizaciones de Australia, Nueva Zelanda y América se llevaron animales y todos provienen de un stock salvaje.

Existen datos de que en el siglo I (a. C.), los romanos tenían conejos en jardines cerrados. A mediados del siglo XVIII se practicaba la cría doméstica del conejo en Inglaterra y antes de finales del mismo siglo se producía con fines comerciales para la obtención de carne. En el siglo XIX fue utilizado como el primer modelo de transferencia embrionaria.

Generalidades

Se diferencia de los roedores por el segundo par de incisivos superiores. Tiene de 26 a 28 dientes, no presentan caninos y sí tienen incisivos, premolares y molares. Los incisivos están separados de los premolares por un espacio denominado diastema. Los incisivos principales tienen un borde cortante y crecen durante toda la vida (elodontes).

Sus ojos son prominentes y con campos visuales independientes y panorámicos, junto con un pequeño campo binocular, lo que le permite un amplio rango de visión. El sentido de la audición y el olfato también están bien desarrollados.

Es un animal herbívoro y su aparato digestivo presenta ciertas características de adaptación tales como la naturaleza de los dientes, estómago con fibras musculares delgadas. El canal pilórico del conejo es de paredes musculares más gruesas que el resto del estómago y termina en el esfínter pilórico (Halabí, 2012). El vaciamiento gástrico se produce por ingesta continua durante el día y de esta forma ir empujando la comida del estómago. También presentan gran producción de bilis y un gran ciego (6 a 12 veces mayor que el estómago) donde se produce la mayor parte de la digestión. No tienen reflejo emético (no vomitan) y soportan hasta un 48 % de pérdida de agua corporal. Una característica fisiológica que distingue a este animal es el hábito de la coprofagia o secotrofia. Consiste en la reingestión de pellets de materia fecal blanda producida en la noche, se excreta durante las primeras horas de la mañana y son tomados directamente del ano. Estos pellets contienen el doble de proteína y la mitad de fibra que los de materia fecal dura debido a la presencia de bacterias productoras de vitamina B en el ciego. La coprofagia comienza entre la tercera y cuarta semana de vida, a aquellos que no se les permite realizar la coprofagia mueren dentro de las 3 semanas siguientes. Pueden vivir comiendo hojas de Belladona que tiene atropina y no se intoxican porque sintetizan atropinesterasa (Wolfensohn, 2013).

Presentan baja densidad ósea, el esqueleto en un ejemplar adulto representa solo el 8 % del peso corporal. Debido a ello son altamente susceptibles a fracturas lumbares o dislocaciones, por lo que se le debe manipular y sujetar correctamente

La orina en las crías (llamadas gazapos) es transparente y sin sedimentación. En el adulto es de diferente coloración y con pH alcalino, la variación de coloración depende de las sales que contenga (Zuñiga, 2016).

En la naturaleza, el conejo se adapta a una amplia variedad de condiciones ambientales, desde el desierto semiárido con un promedio de lluvia anual menor a 180 mm, a climas subtropicales con 1870 mm de agua caída por año. Sin embargo, el clima de pradera es su hábitat ideal. Los hábitos varían de acuerdo al ambiente, así en regiones arenosas viven en cuevas, mientras que en regiones más húmedas cavan galerías o bien viven en huecos de árboles o arbustos.

Las hembras salvajes alcanzan la madurez sexual entre los 4 a 6 meses de edad y los machos un poco más tarde. Si bien los nacimientos ocurren durante todo el año, alcanzan un pico máximo en primavera. El tamaño de camada en la naturaleza es de aproximadamente 5 gazapos. En cautiverio estas hembras no se preñan a menos que se les dé un espacio bastante amplio, también llegan más tarde a la madurez sexual. En general son tímidos y no copulan si se los está observando (Wolfensohn 2013; Zuñiga 2016; Melechon 2018).

Razas y cepas

Presentan tres tipos de pelaje:

- largo, de menor abundancia;
- medio o también llamado *barbas*, de mayor abundancia, y
- corto o *borra*, también llamado subpiel por su abundancia.

En Gran Bretaña existen cerca de 35 razas y más del doble de variedades. La American Rabbit Breeders Association (<https://arba.net>) tiene una lista de 28 razas y alrededor de 80 variedades. Las razas varían en tamaño, tipo de pelo, color de la capa, habiendo sido seleccionadas para la producción de carne, pelo, con fines experimentales, o como mascotas. Como representativas entre las razas de mayor tamaño (mayores de 5 kg de peso) habría que señalar al Gigante de Flandes o al Gigante de Checkered; entre las razas de tipo medio (2 a 5 kg) más representativas estarían la raza californiana o neozelandesa, estas se han desarrollado para la obtención de carne, seleccionándolas a favor de crecimiento temprano y aumento de la eficacia en la conversión de alimentos. Entre las razas de pequeño formato (menores de 2 kg) cabe señalar la Holandesa y la Polaca, muy apreciadas como mascotas.

Existen pocas cepas desarrolladas para fines de laboratorio. Actualmente existen solo 6 cepas endocriadas: New Zealand White (NZW), Watanabe

(WHHL), St. Thomas, AX/JU (JAX), IIVO/JU (JAX), Huston RT. Esto se debe a que es muy costoso establecer un stock de animales endocriados porque disminuye la productividad, aumenta la susceptibilidad a enfermedades infecciosas y aumenta la mortalidad.

Usos en el laboratorio

Es preferible utilizar razas medianas, ya que las pequeñas tienen orejas extremadamente cortas y las inoculaciones se hacen dificultosas. Además, las razas muy grandes son difíciles de manipular, y ocupan cajas más grandes y consumen más alimento. Para extracción de sangre o inyecciones endovenosas se prefiere a las razas de orejas grandes. La cepa New Zealand White (NZW) es la más utilizada en investigación biomédica, ya que, al ser una cepa albina, tiene la vascularización periférica muy visible. Se han utilizado para el desarrollo de fármacos para el glaucoma; en el caso de los conejos New Zealand presentan esta condición de forma hereditaria.

El conejo es utilizado en investigaciones en cirugía cardiovascular y estudios de hipertensión, enfermedades infecciosas, teratología, arteriosclerosis, toxicología (Esteves 2018; Melechon 2018). Es apropiado para estudios sobre reproducción, puesto que presenta ovulación inducida, es decir que al realizar la cópula se desencadena la cadena hormonal que finaliza en la ovulación y fecundación. No presentan

anestro estacional, la gestación es corta y el semen se puede recolectar fácilmente. Presentan una placenta igual a la humana por lo que se utiliza para el estudio de estados de desarrollo embrionario, y transferencia de fármacos a través de la placenta. Se usan también para el estudio de anticonceptivos orales, en serología y para screening de agentes embriotóxicos y teratogénicos.

Biología

La vida reproductiva del conejo se extiende desde los 6 meses a los 3 y 4 años de edad. Su longevidad, en cambio, se prolonga hasta los 5 a 6 años, aunque no es excepcional el que algunos ejemplares alcancen los 15 años (Wolfensohn, 2013).

La embriología del conejo está bien documentada. El embrión, cuya medida es 160 µm de diámetro, es el más grande registrado entre los mamíferos y también de rápido desarrollo. El blastocisto es especialmente grande, 5 mm o más antes de su implantación, y es muy útil en el testeo de sustancias embriotóxicas (Zuñiga 2016; Melechon 2018).

El tiempo de gestación es de 31 a 32 días; cuando las camadas son pequeñas el tiempo de gestación se alarga un poco. El tamaño de camada es de 6 a 10 gazapos. El peso al nacer varía desde menos de 30 g en las razas pequeñas a más de 70 g en razas grandes. El tamaño de camada es inversamente

proporcional al peso, por ejemplo, en una cepa albina el peso promedio al nacimiento varía entre 35 g con una camada de 10 animales y 70 g cuando es de 2 gazapos (Wolfensohn 2013; Zuñiga 2016; Melechon 2018).

Microambiente

Al igual que cualquier otro animal, el conejo debe disponer de un área de alojamiento apropiada a su tamaño y peso. Las hembras lactantes exigen una superficie adicional no menor a 0,19 m² (Tabla 1, anexo III).

En un principio para su alojamiento se utilizaban cajas de madera, pero actualmente se usan jaulas metálicas, las cuales se mantienen limpias a lo largo de varias semanas. Presentan una abertura en la cara posterior para colocar otro compartimiento llamado «gazapera», en la que las reproductoras puedan criar a sus gazapos. Cuando se acerca el momento del parto se colocan las gazaperas. Para crías de tamaño mediano de 30 cm de ancho por 38-40 cm de largo, por 25 cm de alto. Cuando se crían en cajas de madera con piso de paja no es necesario colocar gazaperas (Wolfensohn 2013; Zuñiga 2016; Melechon 2018).

Los conejos deben alimentarse siempre con un preparado comercial, en forma de pellets, y administración *ad libitum*. Se calcula que un conejo debe

consumir diariamente alrededor de 5 g de alimento por cada 100 g de peso. Existe una gran variedad de utensilios para el agua y el alimento. Los recipientes abiertos son menos higiénicos que cuando se utilizan botellas y tolvas ya que los conejos desarrollan el hábito de orinar y defecar dentro del agua y la comida. Lo ideal es usar sistemas automáticos de abastecimiento de agua y tolvas automáticas (Wolfensohn, 2013).

Para el piso de las jaulas el tamaño de la malla de alambre es muy importante, 26 mm de separación entre alambre y alambre es adecuado, de este modo se evitan problemas de tarso. Se utilizan bandejas de aluminio a las que se les coloca material absorbente, ya que las de metal galvanizado son menos resistentes a la orina. Actualmente se recomienda el uso de cajas con pisos y paredes plásticas lo que previene las posibles lesiones en las patas y son más fáciles de sanitizar.

Al destete los jóvenes se trasladan a jaulas o cajas de 1,2 m. de ancho por 1,5 de largo y 0,7 m. de altura. Cada jaula puede albergar de 20-25 animales recién destetados. Como cama se utiliza paja. Para evitar el hacinamiento a medida que crecen se va reduciendo el número de animales. En ocasiones, los conejos que han alcanzado la pubertad resultan sumamente agresivos, de tal forma que, de alojarse juntos los machos, pueden llegar a castrarse unos a los otros. En cuanto a las hembras, y al margen de las lesiones que pudieran infligirse, el agrupamiento homosexual puede producir pseudo-gestación (Wolfensohn 2013; Zuñiga 2016; Melechon 2018).

Macroambiente

Luz: aunque es común el uso de luz natural, se recomienda aumentar las horas luz cuando la duración del día sea menor a 12-14 horas. Hay que tener en cuenta que el encendido brusco de las luces puede provocar fracturas en la espina lumbar ya que al asustarse pueden realizar movimientos bruscos.

En cuanto a la temperatura tienen poca tolerancia a aumentos importantes de temperatura ya que no poseen glándulas sudoríparas; es deseable que se encuentre en el rango de 18 a 20 °C. Es muy importante una buena ventilación. Se recomienda entre 15/20 cambios de aire por hora. Cuando hay una buena rutina de limpieza y la densidad animal es baja, se puede bajar la velocidad de ventilación. Se recomienda entre 50 y 55 % de humedad relativa. Los ruidos se deben evitar, ya que interfieren en la copulación e instinto materno.

Programa reproductivo

La edad reproductiva útil del conejo se extiende desde los seis meses hasta los tres años, siendo suficiente un macho por cada 10 hembras. En las explotaciones intensivas, las hembras se aparean a las 2 semanas de producido el parto, destetándose los gazapos a las 4 semanas, a pesar de que un destete posterior (6-8 semanas) garantizaría una mejor salud y crecimiento de los gazapos. En estas explotaciones, y con

un mejor manejo, cada hembra puede proporcionar 8 camadas por año (Wolfensohn 2013; Zuñiga 2016; Melechon 2018).

Las razas de pequeño formato (Dutch, Polish) se pueden aparear a los 5 meses; las de tamaño medio (New Zealand White, Californiana) no antes de los 7 meses; en tanto que las de gran formato (Flemish, Checkered) no deben iniciar su vida reproductiva antes de los 9 meses.

Las hembras no tienen un ciclo estral, sino períodos de receptividad de 4 a 6 días, la ovulación es inducida por el contacto con el macho antes del apareo. Las hembras se llevan a las jaulas de los machos para el apareo, de lo contrario el macho pierde tiempo olfateando el lugar. En el macho no existe glándula ni glándulas seminales, los testículos bajan en la época reproductiva.

Celo, receptividad sexual y diagnóstico de preñez

En contraste con los roedores, la técnica del frotis vaginal no es adecuada para la detección del estro ya que la hembra es un animal de ovulación inducida y en consecuencia no se puede hablar de un ciclo ovárico. Se puede detectar por la apariencia de la vulva, la cual se ve más alargada y de un color rojo-violáceo por la influencia de los estrógenos. Sin embargo, no es un método del todo seguro, ya que

hay hembras que a pesar de presentar estas características no se preñan y otras sin estos signos sí lo hacen.

Hay que tener en cuenta que las hembras muestran cierta pérdida de receptividad sexual con una duración de 1-2 días cada 4-17 días. Como consecuencia es necesario testear a la hembra antes de colocarla con el macho. Dicho chequeo se hace observando el comportamiento de la hembra frente al macho, la cual presenta una lordosis pronunciada.

Para diagnosticar la preñez se usa la técnica de palpación abdominal suave. Las manos deben colocarse entre las patas traseras, a la altura de la pelvis. Con el pulgar a un lado del abdomen y el resto de los dedos del otro lado, se ejerce una ligera presión, a la vez que se desliza la mano hacia adelante y hacia atrás. La preñez se puede detectar ya a los 9 días del apareo, cuando el útero está engrosado y mide unos 12 mm de diámetro. A los 13 días alcanza los 20 mm y el diagnóstico se hace más fácil. El diagnóstico temprano de preñez es importante porque facilita el manejo de las hembras preñadas y permite el reapareamiento de las que no se preñaron.

En los últimos 3 días de gestación la hembra arranca pelo de su abdomen dejando las mamas al descubierto (4 pares) y lo emplea como material para el nido. Siempre se debe proveer de una gazapera y de material para que arme el nido (paja, viruta, etc.), 3 o 4 días antes del parto.

Tras la cópula infértil es frecuente la presentación de pseudopreñez, estado que también se produce ante la presencia del macho o al ser montada por otra hembra. Cualquiera de estos estímulos determina la ovulación y el cuerpo lúteo subsecuente tiene una persistencia de 15-17 días con secreción de progesterona, que promueve el desarrollo mamario y el que la hembra inicie la construcción del nido. Por eso es muy importante la detección precoz de la preñez.

Parto y canibalismo

Normalmente la gestación dura entre 31 a 32 días, con una camada pequeña puede durar 1-2 días más. Generalmente el parto se produce en horas tempranas de la mañana y pasa inadvertido. El proceso dura entre 7 y 20 minutos. Algunas veces el parto se produce en 2 tiempos, una parte de la cría nace horas más tarde y hasta un día o más también. Por eso es recomendable la palpación postparto. Aquellas hembras que no parieron luego de 34 días se las induce con oxitocina. Los fetos retenidos más allá del día 35 mueren, por lo que algunos productores utilizan directamente oxitocina a los 30 días de gestación.

Puede haber canibalismo, siendo las orejas y las piernas las más atacadas, en casos más graves también se ve afectada la región del tórax y del cuello. El pico máximo de canibalismo se produce el día del parto, ya que la hembra al comer la placenta puede llegar a comer al recién nacido.

Gazapo

Al nacimiento el conejo es inmaduro y depende totalmente de la madre, presenta el pelo muy corto y rápidamente pierde calor, lo que puede ser fatal para el gazapo si se cae del nido (Fig. 15). Es sorprendente el desarrollo que se produce ya a la primera semana, crece muy rápido, el pelo le crece y los movimientos son ágiles y fuertes. No abre los ojos hasta el día 10. Puede salir del nido a la tercera semana y comer alimento sólido.

El destete se realiza a los 30 a 45 días y no de forma abrupta, se deben dejar las crías en la jaula contigua a la de la madre (Zuñiga, 2016).

Manejo

Sujeción

Los conejos nunca deben sujetarse por las orejas por la posible lesión de los cartílagos y además al quedar las patas traseras libres pueden provocar serias heridas al personal. También en el caso del conejo existen diferentes formas de sujeción (Wolfensohn 2013; Zuñiga 2016; Melechon 2018):

1. Tomar con una mano un pliegue de piel del cuello y apoyar sobre la otra mano las patas traseras. La sujeción incorrecta puede llevar a la



Fig. 15: Gazapos de 4 días (Foto Dra Jenny C Saldaña)

producción de luxaciones e incluso a fracturas de columna vertebral.

2. Otra forma de sujeción es tomando con una mano un pliegue de piel del cuello (siempre dejando libres las orejas), mientras que con la otra mano toma un pliegue de piel de la parte posterior del lomo. Este tipo de sujeción solo se debe realizar en trayectos cortos como por ejemplo pasar el conejo de una caja a otra (Fig. 16).
3. Para transportarlos en trayectos más largos debe colocarse el cuerpo del animal sobre el antebrazo del operador, con la cabeza dirigida hacia el codo quedando esta y los ojos tapados (debajo del brazo) (Fig. 17).

Sexado

Se realiza entre dos personas, una de ellas debe tomar el conejo con una mano por la piel del cuello y *sentarlo* sobre la mesa de trabajo, con la otra mano sostiene el tronco del animal. El otro operador debe hacer una suave presión sobre la zona anterior a los genitales, pudiendo de esta forma visualizarlos (Fig. 18).

Identificación

Se utilizan métodos permanentes, como el uso de anillos, tatuajes en orejas, muescas, clips o botones de colores con número de código en las orejas. Para animales recién nacidos se recomienda la marcación



Fig. 16: Método de sujeción del conejo (gentileza de Ms Cs M Ricca y Tec. Carolina Mourelle, <https://www.labanimalstraining.com>).



Fig. 17: Método de sujeción de conejo (foto Dra Jenny C Saldaña)



Fig. 18: Sexado de conejo: Macho a la izquierda, hembra a la derecha (gentileza de MsCs M Ricca y Tec C Mourelle <https://www.labanimalstraining.com>)

por medio de muescas o con colorantes. Existe una gran variedad de anillos para las patas y se colocan en la articulación del tarso antes de las 8-12 semanas (Wolfensohn, 2013).

Bibliografía

- AALAS, (2011): Techniques training: mouse, a visual guide to research techniques. American Association for Laboratory Animal Science, USA. 48 pp ISBN 978-0-9789207-1-5
- Annual Statistics of Scientific Procedures on Living Animals Great Britain 2019 https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/901224/annual-statistics-scientific-procedures-living-animals-2019.pdf
- Dutta S, Sengupta P (2016): Men and mice: Relating their ages Life Sciences 152: 244-248
- Benavides F, Guénet JL (2003): Manual de Genética de Roedores de Laboratorio. Principios básicos y aplicaciones. 312 pp. Ed: Universidad de Alcalá de Henares y Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL). ISBN: 84-8138-584-0
- Bolet M (2004): Aspectos de la historia del descubrimiento de algunas vitaminas. Revista Cubana de Medicina General Integral 20 (4). version impresa ISSN 0864-2125
- Chia R, Festing M (2005): The origins and uses of mouse outbred stocks. Nature Genetics 37 (11): 1181-1186)
- Cruz-Rodríguez A; Armas L; Cruz AP; Hernández A (2017): Desde las primeras nociones sobre la tuberculosis hasta la estrategia «fin de la tuberculosis»: desafíos sociales para la infancia en México. Revista Cubana de Medicina Tropical 69 (2):115. <http://scielo.sld.cu>
- DeCubellis, J. Graham, J. (2013): Gastrointestinal disease in Guinea pigs and rabbits. Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice, 16 (2), 421-435. doi: 10.1016/j.cvex.2013.01.002.
- Esteves P; Abrantes J, et al (2018): The wide utility of rabbits as models of human diseases. Review article. Experimental & Molecular Medicine. DOI 10.1038/s12276-018-0094-1
- Felmer R, (2004): Animales transgénicos: pasado, presente y futuro Arch. Med. Vet., Vol. XXXVI n.º 2, p. 105-117
- Greco C; Gullace F (2020): Manejo reproductivo de rata y raton. Tecnicatura Universitaria de Gestión Integral de Bioterios Facultad de Ciencias Veterinarias UBA. 23 pp
- Halabí M.T., Bahamondes F, Cattaneo G, Adaro L, Flores E (2012): Estomago de Conejo: modelo animal para cirugía experimental. Int. J. Morphol 30(1):82-87
- Jennings M, Batchelor GR, Brain PF, Dick A, Elliot H, Francis RJ, Hubrecht RC, Hurst JL, Morton DB, Peters AG, Raymond R, Sales GD, Sherwin CM, West C.(1999): Refining rodent husbandry: the mouse. Report of the Rodent Refinement Working Party. Lab Anim 1998; 32(3):233-259
- Kaliste E and Mering S (2007): The Welfare of Laboratory Animals, Ed E. Kaliste Springer
- Melechón F, Collins B, Bravo A (2018): Manejo de animales de experimentación. Xunta de Galicia, Consellería do Medio Rural, Santiago de Compostela. 50 pp
- Mourelle AC, Herrero E, Ricca M (2013): Recomendaciones para manipulación y sujeción de ratas y ratones de laboratorio. Spei Domus. 9(19): 39-47.

- Nakagata N (2016): Reproductive engineering Techniques in Mice. 3rd ed. Center for Animal Resource & Development (CARD) Kumamoto University, Japan. Cosmo Bio CO
- Nevison CM, Hurst JL, Barnard CJ. (1999): Strain-specific effects of cage enrichment in male laboratory mice (*Mus musculus*). *Anim Welf* 8: 361-379
- Peirson S, Brown L, Potchecary C, Benson L, Fisk A (2018): Light and the laboratory mouse. *Journal of Neuroscience Methods* 300: 26-36
- Pritchett K, Chou S, Conour L, Elder B (2011). Guidebook on mouse and rat colony management. Published by Charles River Laboratories 136 pp.
- Zuñiga J, et all (2002): Revision taxonomic de las especies del género *Cavia* (Rodentia: Caviidae) en Colombia. *Acta Zool. Mex. (n.s.)* 87: 111-123
- Zuñiga J, Orellana J, (2016): Ciencia y tecnología en experimentación y protección animal formación avanzada de postgrado. Ed: Alcalá de Henares: Universidad de Alcalá; Madrid: Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio SECAL 971 pp. ISBN: 9788416599936
- Weihe WH (1987): The laboratory rat. In *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*. Poole T ed, Longman Scientific & Technical, London, UK 1987; 309-330
- Wolfensohn S., Lloyd M (2013): *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare*. 4th Edition. Wiley-Blackwell Ed 432 pp ISBN 978-1405111591

Sitios web

<https://arba.net>

<https://www.labanimalstraining.com>

<https://geneticabioterio.wordpress.com/animestandarizados>

<https://mousebehavior.org>

<http://www.ratbehavior.org>

Capítulo V.

Vías de administración y toma de muestras

Es común, en los diferentes experimentos realizados con animales, la necesidad de administrar sustancias o tomar muestras. Previo a definir la vía de administración a utilizar o el tipo de muestras que vamos a tomar debemos pensar en el objetivo de nuestro experimento. Cuál es la pregunta que queremos contestar con nuestro experimento, lo obtendremos con el régimen de administración elegido. Siempre debemos considerar si puede hacerse, si debe hacerse o si hay un mejor modo de hacerlo. En cuanto a la vía de administración que elegimos: ¿es la adecuada para nuestro objetivo?, que tasa de severidad tiene esa vía? ¿Conseguiremos los mismos objetivos con una vía menos severa? Si las administraciones se repiten, ¿es la adecuada? La vía de administración siempre estará determinada por el propósito del experimento, la especie animal que estamos utilizando, posibles efectos de la técnica sobre el animal y frecuencia de dosificación (Morton, 2002)

Hay técnicas y vías que son más estresantes que otras por lo que debe elegirse la que provoque menos estrés al animal y menos interacciones con el propósito del experimento. Debemos tener presente que la administración de sustancias puede afectar significativamente el bienestar de los animales y con ello el valor científico de los resultados obtenidos.

Vías de administración

La administración de sustancias es algo muy amplio, se pueden administrar muchos tipos de sustancias, con diferentes tipos de técnicas, rutas diferentes y también propósitos diferentes. Las posibles vías a utilizar se clasifican en (Zuñiga, 2001):

- a. vía enteral: la absorción es a través del intestino, incluyen la vía oral y anal. Se puede administrar en el agua de bebida, en la comida o por medio de una sonda;
- b. vía parenteral: Implica la ruptura de las barreras como la piel y mucosas administrando las sustancias en tejidos (intradérmica, subcutánea, intramuscular o intravenosa) o cavidades internas (vía pleural, vía intraperitoneal);
- c. vía tópica: la sustancia se coloca directamente sobre la piel, y
- d. vía inhalatoria: la administración se realiza directamente en las vías respiratorias.

El seleccionar que vía utilizar dependerá de diferentes factores como por ejemplo la velocidad de

absorción de la sustancia, la tolerancia o la facilidad de la administración. Por ejemplo, si se pretende una absorción rápida la vía de elección será la intravenosa si por el contrario se desea una lenta absorción se elegirá la vía subcutánea.

En este capítulo abordaremos las vías más utilizadas en experimentación con animales tradicionales.¹

1) Vía oral

Se utiliza en general cuando se necesita una exposición sistémica de la sustancia a administrar, se sabe que la absorción gastrointestinal es buena y hay un escaso metabolismo del primer pasaje en hígado. También se utiliza en toxicología a pesar del metabolismo del primer pasaje; o cuando se estudia un efecto local en el tracto gastrointestinal (Morton, 2002).

¹ En Anexo III, encontrara una tabla con las vías adecuadas según la especie y volúmenes a administrar

La sustancia puede introducirse en la boca o directamente en el estómago del animal mediante diferentes técnicas (Morton 2002; Zuñiga 2016):

- a. Inclusión en la comida o el agua: (cuando se requiere administración de compuestos de larga duración en ensayos de carcinogénicos, por ejemplo), es el método menos estresante, pero puede que sea el menos preciso. En lo que refiere a la sustancia administrada pueden surgir algunos problemas: la estabilidad de la sustancia o su homogeneidad en la dieta pueden producir problemas prácticos y científicos y alterar su farmacocinética. La sustancia puede ser poco palatable, sí aporta un sabor desagradable a la comida o agua, los animales consumirán menos; o el efecto contrario si tiene un sabor agradable. La sustancia puede tener un valor nutricional limitado y sin embargo constituir una gran proporción de la comida, lo que alteraría el balance normal de la dieta. En cuanto a la precisión en la dosificación, el nivel de dosis y la duración del efecto no se pueden controlar; la ingesta de agua es particularmente variable y difícil de medir.
- b. Administración orofaríngea de cápsulas, píldoras o fluidos: (cuando es necesario precisión en la dosis o cuando el producto es poco palatable). Para esta técnica se coloca una cantidad conocida de sustancia ya sea en suspensión, encapsulada o sólida, sobre la parte posterior de la lengua y se induce el reflejo de tragar masajeando la garganta.

- c. Sonda oral (evita problemas de palatabilidad y es el método más preciso). El método de elección dependerá de la especie, requerimientos nutricionales, estado fisiológico del animal, propósito del experimento y la precisión de la dosis que se requiera. Se coloca una sonda de alimentación unido a una jeringa o impulsor, se pasa a través del esófago hasta el estómago, no debe sentirse ninguna resistencia mientras se realiza esta maniobra y la sustancia a dosificar se expulsa suavemente a una velocidad regular controlada, suficientemente lenta para evitar la regurgitación (en el caso de las ratas no tenemos este problema). También en esta técnica surgen problemas potenciales: es el método más estresante y técnicamente más difícil de administración oral (Fig. 19). El animal debe ser inmovilizado de forma manual y correctamente, es fundamental asegurar la inmovilización de la cabeza. Si se coloca la sonda incorrectamente o si el animal se mueve la sonda puede penetrar la tráquea o atravesar las paredes del esófago; no se puede usar en dosis repetidas ya que la dosificación frecuente puede producir irritación, inflamación y ulceración del esófago. Se debe mantener el animal inmóvil y buscar el mejor ángulo de la cabeza y el cuerpo para facilitar la administración. Utilizar siempre el tamaño correcto de sonda orogástrica para garantizar que la dosis entra en el estómago y no se queda en el esófago; en ratas y ratones la sonda debe extenderse desde la punta de la nariz hasta la última costilla. En cuanto a la sustancia, esta puede ser irritante y los efectos pueden ser aparentes



Fig. 19: Administración orogástrica (esquema adaptado de Suckow, 2001)

(respiración dificultosa) o no aparentes (úlceras). Una vez realizada la administración, se debe controlar el comportamiento del animal, al igual que con otras vías. En roedores debemos tener en cuenta que comen varias veces al día por lo que difícilmente están con el estómago vacío, por lo que muchas veces es necesario un período de ayuno para administrar de forma correcta con la sonda.

2) Vía subcutánea

Se utiliza habitualmente para la administración parenteral de muchas sustancias. La vía proporciona una lenta liberación, debido a que la sustancia se deposita en tejidos poco irrigados, evitando el metabolismo del primer pasaje por el hígado. El lugar de elección para roedores y conejos normalmente es la región escapular (Fig. 20). Esta técnica es muy dolorosa si el pH o la osmolaridad son incorrectos, o si el material es irritante o citotóxico, puede producir necrosis del tejido. El volumen de fluido que se puede introducir varía con el tamaño del animal, la zona, la laxitud de la piel y la naturaleza fisicoquímica de la sustancia (Morton, 2002).

3) Vía tópica -dérmica

Se utiliza para investigar los efectos tanto locales como sistémicos, que siguen la absorción y metabolismo dérmico. Se puede usar para evaluar agentes potencialmente terapéuticos para enfermedades de la piel, o para evaluar riesgos de irritación, alergias etc. Las pruebas se deben practicar únicamente sobre piel intacta y depilada. Se requiere inmovilización de los animales, evitando que se rasquen o laman la zona donde se aplicó el producto. Los líquidos pueden aplicarse diluidos o no y los sólidos deben reducirse a polvo y humedecidos hasta formar una pasta con solución salina o un solvente apropiado que no *desengrase* la piel. Un problema potencial es que las sustancias irritantes pueden producir serios efectos perjudiciales, para evitar esto toda sustancia que tenga un pH demasiado alto o demasiado bajo se considera irritante y no se debe aplicar por esta vía.

4) Vía intradérmica

Utilizada frecuentemente en estudios de inflamación, sensibilización y diagnóstico de flujo sanguíneo cutáneo e inmunología. La inyección se hace entre las capas exteriores de la piel, normalmente el lomo, se debe depilar la zona al menos una hora antes de la inyección. Se coloca la aguja paralela a la superficie de la piel y se introduce unos pocos milímetros dentro de ella. Es esencial tener una buena técnica para asegurar que la administración es intradérmica y no

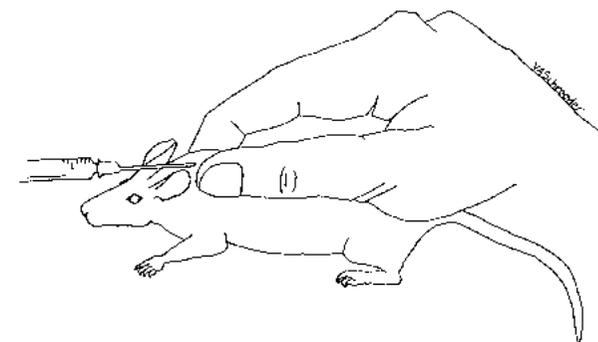


Fig. 20: Esquema de administración subcutánea (adaptado de Suckow, 2001)



Fig. 21: Administración intradérmica en ratón (adaptado de www.bioterios.com)

subcutánea, al realizar la administración por esta vía se observa la formación de una pequeña pápula en el lugar donde se hizo (Fig. 21). En general, es una vía utilizada en conejos, si se realiza en pequeños roedores estos deben estar anestesiados para evitar el estrés y asegurar una buena administración y evitar el movimiento del animal durante la administración (Morton 2002; Zúñiga 2016)

5) Vía intraperitoneal

Se utiliza para administrar volúmenes relativamente grandes de sustancias solubles (por ej., anestésicos en pequeños animales: ratas y ratones), cuando es necesario que se absorban con rapidez y cuando la vía oral o la intravenosa no son las apropiadas. La técnica implica la inyección en la cavidad peritoneal a través de la pared abdominal. Cuando se administra en un ratón, por ejemplo, se lo sostiene decúbito dorsal y con la cabeza inclinada hacia abajo para producir un desplazamiento de las vísceras con el fin de no lesionarlas. Para evitar perforar las vísceras abdominales se debe introducir la aguja rápidamente con un ángulo de 30°, ligeramente a la izquierda de la línea media del abdomen (Fig. 22). Esta vía no se debe utilizar de manera rutinaria (excepto para la administración de ciertos anestésicos) mientras haya otras vías accesibles y más adecuadas al objetivo de la investigación. El uso repetido de esta técnica puede producir un serio estrés debido a la inmovilización, los efectos irritantes acumulativos, el daño de

la aguja y el riesgo potencial de inyectar en los órganos abdominales (Morton 2002; Zúñiga 2016).

6) Vía intramuscular

En general se utiliza como vía de administración sistémica, en estudios de liberación lenta en los que se emplean implantes o formulaciones oleosas, para valorar vacunas y para administrar anestésicos. La inyección debe hacerse en una masa muscular suficientemente grande, adecuada al propósito del procedimiento y lejos de los vasos sanguíneos y nervios mayores para evitar daño (Fig. 23). Esta vía debe usarse solo si no es posible utilizar una alternativa menos dolorosa o si se requiere clínicamente. La irritación potencial de una sustancia cuando se inyecta por vía subcutánea o intraperitoneal no debe servir de razón para elegir la vía intramuscular, ya que es igualmente probable que sea irritante. Antes de usar esta técnica se debe considerar cuidadosamente lo que se intenta conseguir, la probable lesión, si hay otra alternativa, si se administra una sola vez o se requieren dosis repetidas. Esta técnica no se debe utilizar en animales pequeños (por ej., ratas y ratones) (Morton 2002; Zúñiga 2016).



Fig. 22: Administración intraperitoneal (Foto Dra. Jenny Saldaña)



Fig. 23: Vía intramuscular en conejo (Gentileza de MsCs M Ricca y Tec C Mourelle <https://www.labanimalstraining.com>)

7) Vía intravenosa

Se utiliza con frecuencia en experimentos fármaco-toxicológicos para simular la vía de exposición a formulación de drogas, productos de reposición de sangre, soluciones de nutrientes, y agentes infecciosos y de diagnóstico. Asegura la máxima exposición al plasma de la forma más rápida posible y evita la posibilidad de eliminación por el metabolismo preenterohepático. En la mayoría de los casos en la administración intravenosa, las sustancias se introducen mediante una única inyección en la vena periférica más adecuada, siempre se requiere cierto grado de inmovilización. La vía intra-arterial se utiliza excepcionalmente, en general en conejos y la inmovilización es necesaria, el lugar habitual es la arteria central de la oreja (Fig. 24). Las inyecciones deben hacerse en condiciones asépticas, en la misma dirección que fluye la sangre y se deben administrar a un ritmo lento y constante. Existen problemas potenciales como en los casos anteriores: la capacidad tamponadora de la sangre permite la lenta administración de un amplio rango de pH (2 a 11). Las formulaciones deben ser miscibles en sangre sin que precipiten. No deben causar hemólisis o coagulación ni generar reacciones degenerativas o inflamatorias en las paredes de los vasos. En ratas y ratones se utiliza la vena de la cola (Fig. 25), colocando los animales siempre en un cepo especial para ello. En cuanto al volumen a administrar, la adición de grandes volúmenes de fluido producirá hemodilución, aumento de la presión venosa central, alteraciones del equilibrio ácido / base, diuresis y edema pulmonar. Se debe evitar el incremento del volumen sanguíneo en más

del 4 % por la inyección rápida o al infundir más de 4 ml/kg/h. Si el animal se mueve sacando la aguja del vaso sanguíneo parte del líquido puede ser inyectado perivascular o subcutáneamente produciendo una tumefacción de la piel adyacente. Una mala técnica de administración puede dañar el vaso dificultando las inyecciones posteriores (Morton 2002; Zuñiga 2016; Yllera 2020).

Cabe aclarar que estas no son las únicas vías de administración existentes, si son las más utilizadas, Como ejemplo de otras vías esta la intranasal que cuando se aplica en ratas o ratones lo ideal es que estén sedados para poder realizar de forma correcta la técnica.

Toma de muestras

Colecta de sangre

La toma de muestras de sangre en animales de experimentación es un procedimiento experimental de rutina. Idealmente las muestras de sangre deben ser mínimamente invasivas y tener un mínimo impacto en el bienestar del animal y en los datos experimentales (Teilmann, 2014). Existen variadas técnicas para colecta de sangre según sea la especie en uso y el motivo de la colecta. Siempre debemos tener en cuenta que los procedimientos de recolección de sangre si se hacen de forma descuidada son

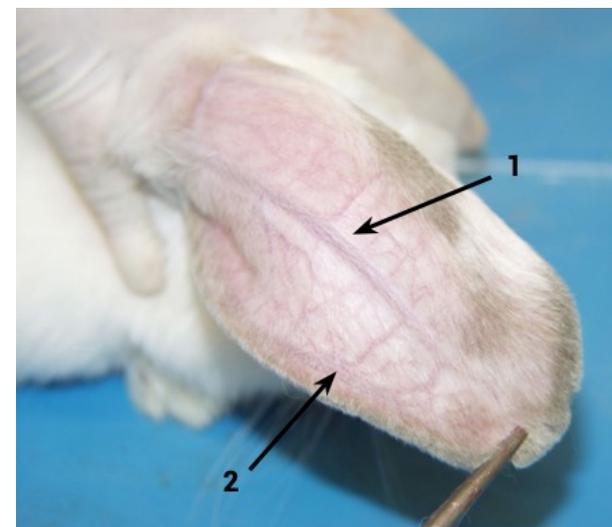


Fig. 24: Vasos de oreja de conejo 1: arteria central, 2: vena marginal (adaptado de Yllera, 2020)

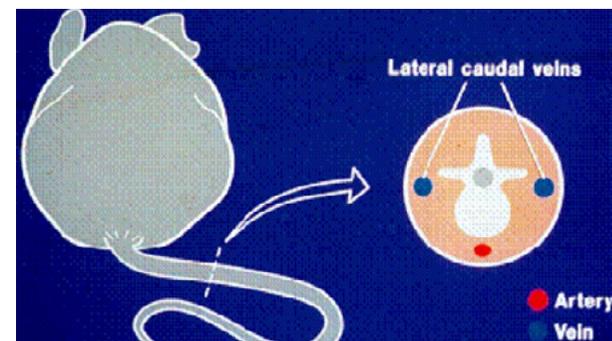


Fig. 25: Esquema de la cola de rata o ratón y sus vasos (adaptado de University of British Columbia, 2007)

estresantes para el animal, esto tendrá un impacto negativo en los parámetros de estudio y por ende en los resultados. Es muy importante que al igual para las diferentes técnicas de administración que recién mencionamos, el personal que está a cargo de este tipo de maniobras aprenda muy bien el manejo de los animales para realizar estas técnicas y de esta forma minimizar su estrés. Para elegir la mejor técnica se debe tener conocimiento de algunos parámetros relacionados a la especie seleccionada, por ejemplo, edad, peso, sexo, estado sanitario del animal, tipo de muestra necesaria (suero, plasma, etc.), si es necesario que sea estéril o no, cantidad de muestra, frecuencia de toma de muestra y como ya se mencionó la formación y experiencia del operador.

La cantidad de sangre que es posible extraer dependerá del tamaño del animal, en general la volemia de un animal es el 7 % del peso corporal (Tabla 4, Anexo III). Debemos tener presente que el volumen de sangre extraído se recupera en 24 hs, pero los eritrocitos circulantes llevan más tiempo en llegar a sus niveles normales. Si realizamos una extracción rápida o repetida sin reposición de fluidos, podemos provocar un shock hipovolémico en el animal (pulso rápido y débil, mucosas secas y pálidas, piel y extremidades frías, hiperventilación, etc.).

A continuación se describirán las vías de colecta de sangre más comúnmente utilizadas en animales de laboratorio.

1) Vena safena

Es una técnica que no requiere de anestesia, pero si de una buena sujeción del animal, se obtiene un volumen pequeño de sangre y la calidad de la muestra es variable y no es sangre estéril. La vena safena se encuentra en la superficie externa del muslo (Fig. 26), lo ideal es afeitar la zona antes de tomar la muestra, al pinchar la vena se pueden recoger las gotas que surgen, se puede realizar esta técnica en ratas y ratones (Aasland 2010; Parasuraman 2010; Kumar 2017).

2) Vena de la cola

Es muy utilizado en ratas y ratones, se puede realizar con agujas de pequeño calibre o por medio de cánula. El animal debe ser inmovilizado en un cepo una vez allí desinfectar la cola con alcohol 70 % para evitar contaminación de la muestra. Generalmente es necesario calentar la cola por medio de agua tibia o una luz para producir vasodilatación y poder observar las venas laterales de la cola (Fig. 25). Para hacer la extracción se coloca la aguja con el bisel hacia arriba de forma paralela a la cola, es aconsejable comenzar lo más próximo al extremo de la cola de esa forma la vena hacia arriba puede seguir utilizándose para futuras muestras (Fig. 27) (Aasland 2010; Parasuraman 2010; Kumar 2017).

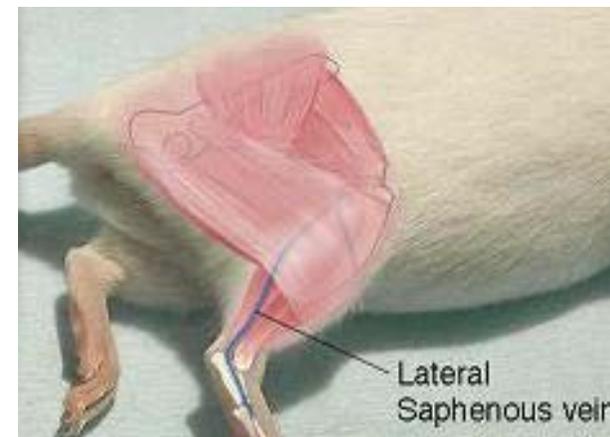


Fig. 26: Ubicación de vena safena (adaptado de Kumar, 2017)



Fig. 27: Colecta de sangre de la cola (adaptado de Kumar, 2017)

3) Seno retrobulbar o retroorbital

Es un método muy utilizado en roedores de laboratorio, controversial y que genera grandes debates. Existen autores que expresan que si quien aplica esta técnica tiene la suficiente experiencia no producirá serios daños a los animales, por otro lado, están quienes afirman que si se pueden producir importantes daños en el tejido orbital del animal, así como afectar de manera importante su bienestar (Teilmann, 2014). En general es un procedimiento no recomendable ya que puede producir ceguera en el animal si el operador no tiene un buen entrenamiento, su utilización debe estar muy bien justificada (Neves, 2013), además el protruir el globo ocular e impedir que el animal cierre el párpado, para poder tomar la muestra, puede producir sequedad, daño y dolor lo que llevara al animal a provocar arañazos en el ojo con posibles lesiones (JoVE, 2020). Es aconsejable que el animal este anestesiado para aplicar esta técnica (Parasuraman 2010; Neves 2013; Kumar 2017). Se debe tener en cuenta las diferencias anatómicas en ratas y ratones, las ratas tienen un plexo de vasos que desembocan detrás del ojo, mientras que los ratones tienen una colección de vasos que forman un seno retro-orbital por lo que es más fácil practicar este procedimiento en los ratones (Fig. 28). Para aplicar esta técnica el animal debe ser colocado sobre una superficie lisa y se penetra con un tubo capilar para hematocrito en un ángulo de 45° en el ángulo medial del ojo sobre el globo ocular, girar levemente el capilar durante la entrada esto corta las membranas conjuntivales rompiendo el plexo ocular o seno orbital (Fig. 29), y la sangre fluirá por el capilar. Para

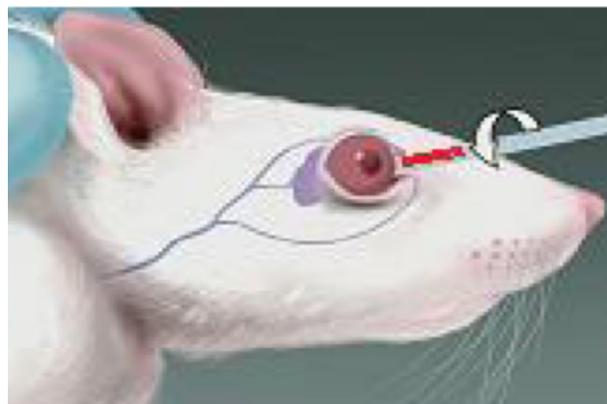


Fig. 28: Esquema de toma de sangre retroorbital (adaptado de Neves, 2013)



Fig. 29: Muestra retro-orbital (adaptado de JoVE, 2020)

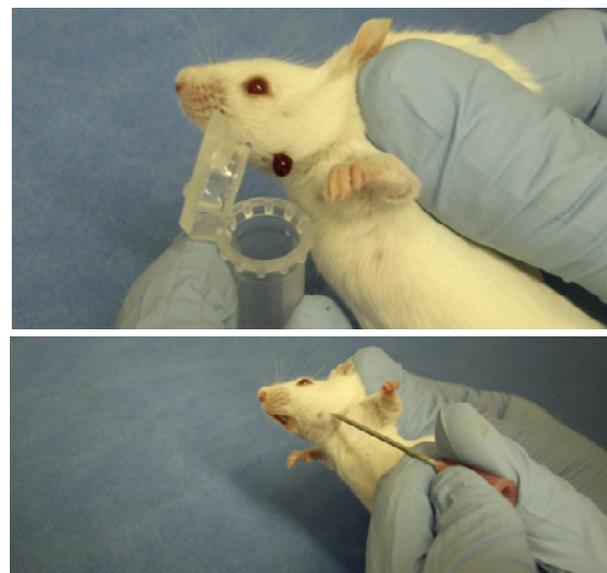


Fig. 30: Colecta de sangre de la vena facial (adaptado de Neves, 2013)

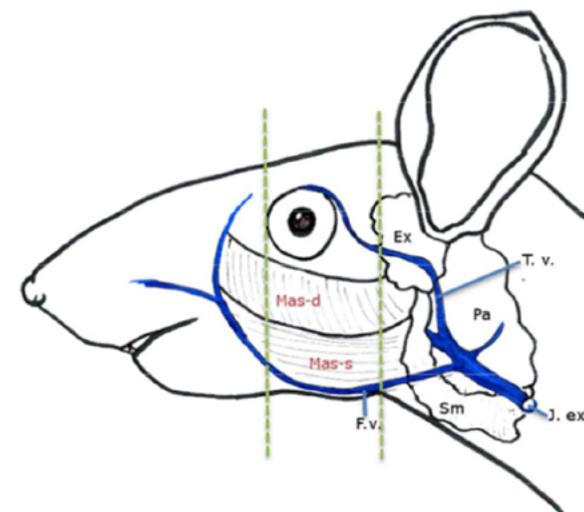


Fig. 31: Vista anatómica: F.v.: vena facial. Estructuras relacionadas: Ex: glándula lacrimal extraorbital, Pa glándula parótida, Sm: glándula submandibular, Mas-d y Mas-s: músculos maseteros, T.v: vena superficial temporal, J.ex: vena yugular externa (adaptado de Teilmann, 2014)

detener el sangrado se debe soltar la piel que se tenía sujeta y dejar que el ojo vuelva a su posición normal, aplicar presión para promover hemostasis. Se puede utilizar además de la anestesia general un anestésico oftálmico (Parasuraman, 2010).

4) Seno facial

Método comúnmente utilizado en ratones como alternativa al seno orbital, en general también confundida con la punción en la vena superficial temporal (Figs. 30 y 31). A pesar de ello es un método que puede causar daño en el oído y en los músculos masticatorios causando dolor al masticar y con ello importante estrés. Esta técnica también se asoció en algunos casos con hemorragia descontrolada que causa shock hipovolémico y muerte en ratones (Parasuraman 2010; Teilmann 2014). Para esta técnica no se recomienda el uso de anestesia para que no se produzca una relajación de los músculos faciales y en consecuencia cambiar la ubicación del plexo sanguíneo.

5) Punción intracardíaca

Procedimiento que se puede aplicar en ratas, ratones y conejos; es un procedimiento terminal que se practica bajo anestesia profunda. Se obtiene una buena cantidad de sangre ya que se puede sangrar a blanco al animal (Kumar, 2017).

Para obtener esta muestra de sangre, una vez que el animal está bajo anestesia profunda corroborada por los diferentes pruebas de sensibilidad a estímulos dolorosos, se coloca el animal decúbito dorsal se limpia la zona torácica con algún sanitizante (ej.: alcohol 70 %), se busca el corazón con los dedos introduciendo la aguja en un ángulo de 45° con una leve inclinación a la izquierda (Fig. 32). Al pinchar el corazón la sangre fluirá y se debe ir retirando el émbolo lentamente (Fig. 33) (Parasuraman 2010; Kumar 2017).

Muestras de heces y orina

La obtención de muestras de heces en pequeñas cantidades puede hacerse directamente del ano del animal.

En el caso de muestras de orina pueden obtenerse de forma directa de la uretra por medio de una sonda vesical. Pero si es necesario obtener gran cantidad de muestra o durante un período determinado de tiempo se debe utilizar una jaula metabólica. Consiste en una caja especial que mantiene el animal y con suelo de rejilla por dónde caen las heces y orina y consta de un sistema que separa ambas y son recogidas en diferentes recipientes. Además, esta jaula permite administrar agua y comida en cantidades determinadas por el investigador (Zuñiga, 2016).



Fig. 32: Esquema de punción cardíaca (adaptado de Neves, 2013)

Colpocitología vaginal exfoliativa

En esta sección se abordan los contenidos que implican la obtención de un frotis vaginal con el objetivo de estimar en qué momento se encuentra una hembra dentro del ciclo estral.

A partir de la pubertad, las hembras inician su madurez sexual aun cuando no han completado su desarrollo corporal. Una vez alcanzado este punto, las hembras (en ratas y ratones) comienzan a tener ciclos estrales, de duración aproximada a 5 días, que se repiten constantemente y solo se interrumpen con la gestación, la lactación o la vejez. Las hembras con estas características antes mencionadas se clasifican como poliéstricas continuas (Zuñiga, 2001).

El ciclo estral no es más que una serie de eventos concatenados que llevan a las hembras al estro, una fase fundamental en donde aceptará la monta y ovulará. Clásicamente se divide a este ciclo en dos fases y cuatro etapas: fase folicular (proestro, estro) y fase luteal (metaestro y diestro). Cada una de estas etapas está determinada por las concentraciones plasmáticas de un conjunto de hormonas producidas en el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal. Las dos fases del ciclo estral se definen según la o las estructuras que componen el aparato reproductor femenino, en especial el ovario y el útero. De esta forma llamamos fase folicular a la etapa en la que en los ovarios hay folículos en desarrollo. Dentro de esta fase tendremos al proestro y al estro, y una hormona predominante en sangre son los estrógenos, producidos por dichos folículos. Se le denomina fase luteal, a aquella



Fig. 33: Extracción de sangre intracardíaca (foto Dra. Jenny C Saldaña)

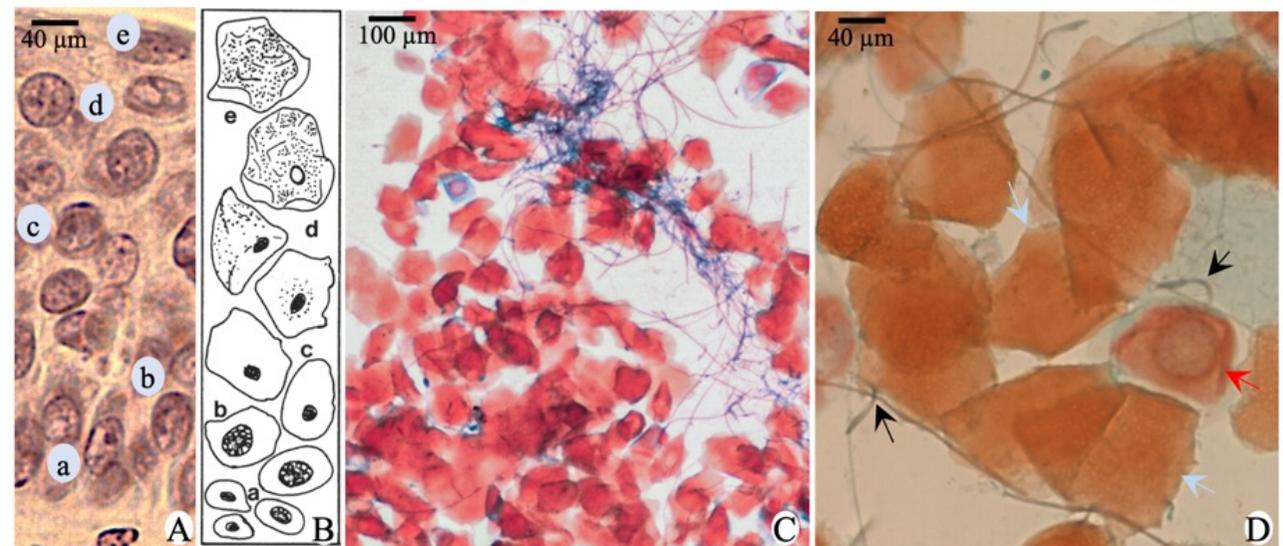


Fig. 34: A: se observa a mayor aumento el epitelio estratificado plano de revestimiento vaginal. B: se observa un esquema interpretativo de las células que constituyen el epitelio de revestimiento vaginal (adaptado de Dellman, 2006). En las imágenes A y B se observan células: a, basales; b, parabasales; c, intermedias; d, superficiales; e, queratinizadas. C: se observa un frotis vaginal en proestro coloreado con la técnica de Shorr (Bancroft, 2013). D: se observa en el mismo frotis a mayor aumento con flechas rojas células superficiales queratinizadas a las que aún se les observa el núcleo, con flechas negras células parabasales. Foto: Dra. P. Genovese.

en la que se encuentran uno o varios cuerpos lúteos activos en el ovario, que producirán principalmente progesterona (Dellman, 2006).

Tanto la progesterona como los estrógenos actúan sobre diversos órganos y tejidos blanco, entre ellos el útero y el epitelio vaginal, provocando importantes cambios histológicos. Aprovechando su fácil acceso, es posible obtener muestras citológicas del epitelio vaginal que se descama continuamente durante el ciclo y correlacionar el tipo celular con la hormona ovárica predominante durante el ciclo. El estudio del aspecto de las células que se descaman del epitelio se puede establecer con bastante precisión la etapa en el ciclo estral en que se encuentra una hembra (Dellman, 2006).

La técnica que utilizamos para observar al conjunto de células que predominan en la luz de la vagina es conocida como frotis vaginal o colpocitología vaginal exfoliativa y podrá ir acompañada de alguna técnica de coloración o no, ya que aquellas personas entrenadas en esta identificación celular podrán observar el frotis directamente al microscopio.

En líneas generales se puede afirmar que al aumentar los estrógenos se incrementa el espesor del epitelio, pero al mismo tiempo estas células comienzan a queratinizarse. El resultado final será tener una mayoría de células superficiales, gigantes, muy queratinizadas y por lo tanto muertas. Así, en el proestro observaremos una mezcla de células, algunas pocas basales, muchas parabasales e intermedias y algunas gigantes queratinizadas (Fig. 34).

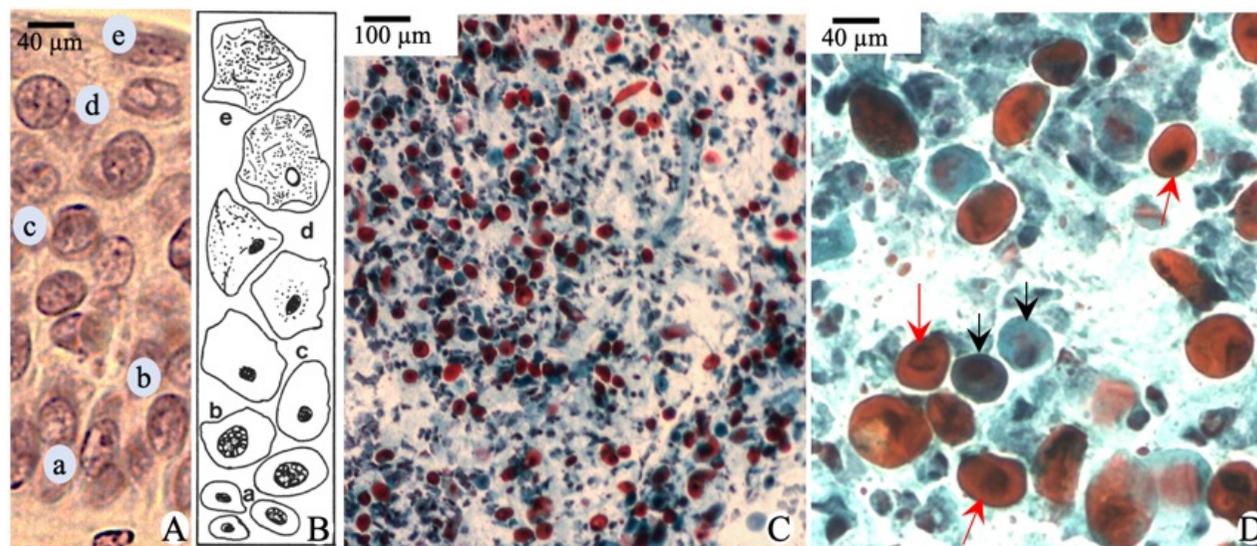


Fig. 35: En la imagen A se observa a mayor aumento el epitelio estratificado plano de revestimiento vaginal. En la imagen B se observa un esquema interpretativo de las células que constituyen el epitelio de revestimiento vaginal (modificado de Dellman, 2006). En las imágenes A y B se observan células: a, basales; b, parabasales; c, intermedias; d, superficiales; e, queratinizadas. En la imagen C se observa un frotis vaginal en proestro coloreado con la técnica de Shorr (Bancroft, 2013). En la imagen D se observa en el mismo frotis a mayor aumento con flechas rojas células superficiales queratinizadas a las que aún se les observa el núcleo, con flechas negras células parabasales.

Foto: Dra. P. Genovesi

En el estro se observan, casi en su totalidad, células gigantes superficiales (Fig. 35). Es interesante que el estro en estos animales dura unas pocas horas, por lo que es importante determinar en qué etapa se encuentra la hembra para ajustar el manejo reproductivo y el encuentro con el macho.

Luego del estro, en el ovario se forman uno o varios cuerpos lúteos (fase luteal), aumenta la progesterona y en los frotis (metaestro o diestro) se observan gran cantidad células epiteliales pequeñas o medianas, a las que les distingue el núcleo y se observarán además abundantes leucocitos (Fig. 36).

La obtención de la muestra a observar se hará colocando con pipeta una gota pequeña de solución fisiológica dentro de la vagina y retirándola inmediatamente para extenderla en un portaobjetos (Marcondes, 2006). Como ya mencionamos antes, las personas entrenadas podrán observar en el momento y reconocer los tipos celulares sin aplicar coloración, la técnica de coloración de Shorr brinda un color naranja intenso a aquellas células queratinizadas y colores azulados o verdosos al resto de las células (Bancroft, 2013). Conociendo la proporción de cada tipo celular podemos estimar en qué etapa se encuentra el animal, cuando la hembra está en estro el animal está expresando el comportamiento típico de celo, sus células de descamación vaginal son queratinizadas y se observan naranjas con la técnica de Shorr.

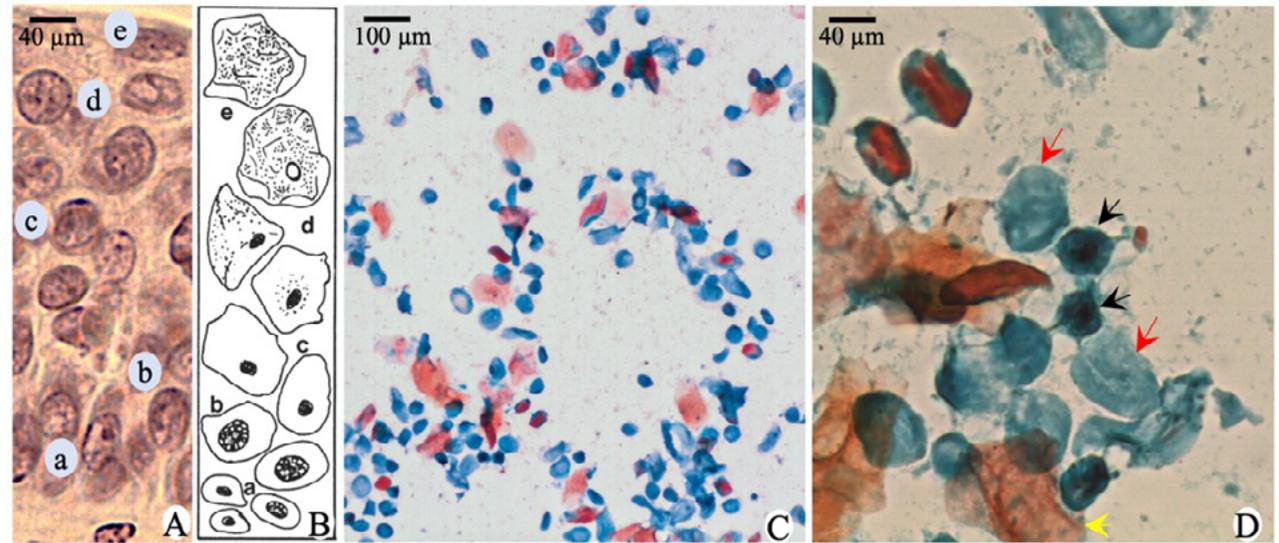


Fig 36: A: se observa a mayor aumento el epitelio estratificado plano de revestimiento vaginal. B: se observa un esquema interpretativo de las células que constituyen el epitelio de revestimiento vaginal (adaptado de Dellman, 2006). En las imágenes A y B se observan células: a, basales; b, parabasales; c, intermedias; d, superficiales; e, queratinizadas. C: se observa un frotis vaginal en metaestro coloreado con la técnica de Shorr (Bancroft, 2013). D: se observa en el mismo frotis a mayor aumento con flechas rojas células intermedias, con flechas negras leucocitos, con flecha amarilla célula superficial queratinizada.

Foto: Dra. P. Genovese

Inmunización

El procedimiento de inmunización se utiliza para la obtención de anticuerpos policlonales y monoclonales y debe estar guiado por minimizar el malestar y sufrimiento a los animales (Russell, 1959).

La especie a utilizar debe elegirse con cuidado teniendo en cuenta la cantidad de antisuero requerido, la relación filogenética entre el origen de la proteína a usar para inmunizar y la especie de la que se pretende obtener el anticuerpo y la aplicación que se pretende dar al mismo (Canadian Guidelines, 2002). Los animales más frecuentemente utilizados en inmunización para la obtención de antisuecos y anticuerpos policlonales son los conejos y los ratones; los ratones BALB/c son además utilizados en la producción de anticuerpos monoclonales. Este procedimiento está siendo progresivamente reemplazado por las técnicas de obtención de anticuerpos recombinantes de expresión en fagos (Shim, 2017).

Para un procedimiento de inmunización en un animal, debe administrarse un antígeno normalmente por una vía parenteral y en determinada dosis. Un protocolo de inmunización consta de una primera administración, llamada *priming* o inicio y un número variable de sucesivas administraciones llamadas *boosters* o recuerdos.

El antígeno no se administra en forma soluble, sino que para estimular la respuesta inmune es incorporado en una formulación altamente viscosa o particulada llamada inmunógeno, comúnmente una emulsión,

aunque también puede tratarse de una suspensión. El inmunógeno contiene en general además un adyuvante, componente capaz de estimular de forma inespecífica la respuesta inmune.

Para la mayoría de los casos los animales más pequeños no se utilizan en producción, a menos que se necesite muy pequeño volumen de suero. Los animales más utilizados para la producción de anticuerpos policlonales son los conejos, debido a que se puede obtener un volumen adecuado de antisuero de alto título y elevada afinidad y a la practicidad de su manejo. De una sangría de un conejo típicamente se obtiene 250 mg de anticuerpos policlonales, y una sangría terminal con desplazamiento con salina puede permitir obtener 1 g (Canadian Guidelines, 2002). En forma ocasional, con fines de producción, se necesita utilizar animales más grandes, tales como cabras, ovejas o caballos (Harlow, 2014). Se debe tratar de limitar la frecuencia de uso de animales y el tiempo que cada uno de ellos se utiliza para obtener antisuero.

Un antisuero policlonal puede obtenerse en 1 o 2 meses (Canadian Guidelines, 2002) y sus aplicaciones son múltiples en investigación y procesos productivos.

Para la obtención de anticuerpos, se utilizan protocolos de inmunización que deben incluir varios puntos a ser considerados que veremos a continuación (Canadian Guidelines 2002, Harlow, 2014):

1. Método de preparación del antígeno: la solución del antígeno de ser posible debe ser esterilizada

por filtración por 0,22 µm y el pH mantenerse próximo al fisiológico (pH 7,2-7,4) así como la fuerza iónica en I = 150 mM.

2. Uso o no de adyuvante y cuál se utilizará: debe elegirse cuidadosamente el adyuvante, de ser posible evitarse el uso de Adyuvante Completo de Freund (ACF), o de lo contrario usarlo solo para la primera inoculación o *priming* y prepararlo con no más de 0,5 mg/ml de Mycobacteria (Morton 2001; Harlow, 2014). El adyuvante de Freund está compuesto de aceite mineral (vaselina líquida), un agente emulsificante (Arlacel) y para obtener la composición completa (ACF) se añaden células muertas de Mycobacterium tuberculosis. El ACF se utiliza únicamente para el *priming* (Canadian Guidelines, 2002). En las siguientes inoculaciones del protocolo se utiliza el Adyuvante Incompleto de Freund (AIF), que a diferencia del ACF este no posee las bacterias muertas. Los adyuvantes colaboran en obtener y mantener una respuesta inmune que con el antígeno en forma soluble no se obtendría. En particular el ACF da lugar a respuestas inflamatorias muy intensas en el sitio de inoculación (granulomas) (Harlow, 2014). Los adyuvantes actúan de diversas formas, por ejemplo, formando un depósito que libera el antígeno con lentitud y sostiene así la estimulación del sistema inmune. Pueden activar directa o indirectamente diferentes poblaciones celulares involucradas en la respuesta e influir sobre las subclases de anticuerpos obtenidos y su avidéz (Hunter, 1995). También pueden permitir la disminución de la

dosis de antígenos a veces muy escasos o costosos. Se han descrito muchos adyuvantes, otro de los más utilizados es el hidróxido de aluminio. En general el inmunógeno se prepara emulsificando la solución del antígeno con el adyuvante de Freund o mezclando el antígeno con el hidróxido de aluminio.

3. Vía de inyección y número de sitios donde se administrará: se debe elegir la vía de inmunización procurando el menor sufrimiento al animal. Puede ser subcutánea (SC), intramuscular (IM), intradérmica (ID), intraperitoneal (IP), o intravenosa (IV). La vía SC o la ID deben usarse para inmunógenos viscosos, esta última no debe usarse en animales pequeños (ratones, ratas) y en conejos restringirse a casos necesarios y no debe administrarse más que pequeños volúmenes por punto de inyección (25 µl). La vía IM no puede usarse en animales pequeños con inmunógenos viscosos. La vía IV puede ser la ruta de elección para inmunógenos con pequeñas partículas, pero no puede usarse para emulsiones o inmunógenos con grandes partículas que podrían causar embolia. No se recomienda la vía IP para la obtención de anticuerpos policlonales.
4. Volumen a administrar: los volúmenes de inoculación se recomiendan sean lo menores posibles, e incluso aumentando el número de sitios de inoculación se disminuye el stress del proceso inflamatorio post- inoculación.

5. Cronograma de inoculaciones: es aconsejable antes de iniciar el protocolo de inmunización obtener una pequeña muestra (100 µl en ratón o 1 ml en conejo) de sangre al día o para utilizarlo como control de la respuesta (Harlow, 2014). El tiempo de los *boosters* puede influir sobre el resultado de la inmunización, tanto sobre el cambio de clase de Inmunoglobulina M (IgM) a Inmunoglobulina G (IgG) como sobre la inducción de células de memoria.

En general el *booster* debe administrarse después que el título de anticuerpos ha comenzado a disminuir y cuando las células de memoria han comenzado a aumentar. Si no se utiliza para el *priming* un adyuvante que forma depósito, el título de anticuerpos tendrá un pico a las 2-3 semanas posinmunización, si por el contrario el adyuvante forma depósito, el pico tardará al menos 4 semanas después de la primera inmunización. Posteriormente se procede a la extracción de sangre. En la mayoría de los casos, se alcanza el punto final con dos *boosters*, lo que es suficiente para alcanzar un título elevado de anticuerpos. Usualmente se hacen controles por inmunoensayos para verificarlo.

Inmunización en ratones

Los ratones son sumamente utilizados para estudios de inmunología y frecuentemente en estudios de inmunización. En ellos se administra el antígeno formando parte del inmunógeno en sucesivas etapas y por diferentes vías. Las vías más utilizadas son la

intraperitoneal y la intramuscular. La vía intraperitoneal admite mayor volumen. La dosis de un antígeno soluble en ratón es de 50-100 µg (Tabla 6, anexo III).

Típicamente, de una sangría de un ratón se puede obtener 100-200 µL de suero y en total puede llegar a obtenerse 2 ml de suero. Es usual en ratones utilizar anestesia por inhalación para este procedimiento.

Inmunización en conejos

Si se trata de una única proteína como antígeno, cada dosis de inmunógeno deberá contener unos 50-1000 µg, aunque lo más común es de 300-500 µg.

En general en conejos se utiliza una vía para el *priming*, que puede ser ID o SC, estas admiten mayores volúmenes, dado que se usan múltiples sitios de inoculación con pequeños volúmenes. Para los *boosters* suele utilizarse la vía IM. La zona de inoculación intradérmica es el lomo, entre las escápulas y sobre las primeras costillas a lo largo de la columna vertebral. Debe cortarse el pelo de la zona donde se realizará la inoculación para facilitar la operación. Las inoculaciones IM se administran en los músculos de mayor tamaño (Fig. 5). Están descritos (Harlow, 2014) los tiempos entre inoculaciones, a modo de ejemplo es común entre el *priming* y el primer *booster* dejar transcurrir un mes, y entre el primer y el segundo *booster* unos 20 días. Luego del segundo *booster* lo más común es realizar la extracción de sangre a 7-10 días. Puede realizarse sucesivos *boosters* mensuales y sangrías a los 7-10 días (Tabla 7, anexo III).

Bibliografía

- Aasland K, Skjerve E, Smith A (2010): Quality of blood samples from the saphenous vein compared with the tail vein during multiple blood sampling of mice. *Laboratory Animals* 44: 25-29. DOI: 10.1258/la.2009.009017
- Bancroft J.D., Layton C., Suvarana S.K. (2013): *Theory and practice of histological techniques*. Sexta edición. Capítulos 4 y 10. Editorial: El Sevier
- Canadian Council on Animal Care (2002): *Guidelines on antibody production*. <http://www.cac.ca> ISBN: 0-919087-37-X
- Dellman D., Eurell J.A., Frappier B.L. (2006): *Textbook of Veterinary Histology*. Sexta edición. Capítulo 13. Editorial: Blackwell.
- Harlow E, Lane D (2014): *Antibodies: A Laboratory Manual (Second Edition)*. 750 p. Cold Spring Harbor Laboratory ISBN: 9781936113811
- Hunter, R.L., Olsen, M.R., Bennett, B. (1995): Copolymer Adjuvants and TiterMax™. In: *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (ed. D.E.S. Stewart-Tull). New York NY: Wiley. ISBN-13: 978-0471951704
- JoVE Science Education Database. Lab Animal Research. Blood Withdrawal I (2020). JoVE, Cambridge, MA, (<https://www.jove.com/science-education/10246/blood-withdrawal-i>)
- Kumar M, Dandapat S, Prasad Sinha M, Kumar A, Singh Raipat B (2017): Different blood collection methods from rats: a review *Balmeo Research Journal* vol 8(1): 46-50. DOI: <http://dx.doi.org/10.12680/balmeo.2017.141>
- Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. (2002): Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol* 62:609-14.
- Morton D, Jennings M, Buckwell A, Ewbank R, Godfrey C, Holgate B, Inglis I, James R, Page C, Sharman I, Verschoyle R, Westall L y Wilson A (2002): Refinando los procedimientos para la administración de Sustancias. Informe del Grupo de Trabajo sobre Refinamiento formado por BVA/AFW/FRAME/RSPCA/UAWAF. *Laboratory Animals*, edición en español. 46 pp
- Neves S, Mancini Filho J, Wenzel de Menezes E. (2013): *Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do biotério de produção e experimentação da FCF-IQ/USP*. Universidad de Sao Paulo, Faculdade de Ciencias Farmacêutica, Instituto de Química Ed: 216 pp ISBN 978-85-85285-09-8
- Parasuraman S, Raveendram R, Kesavan R (2010): Blood sample collection in small laboratory animals. *J Pharmacy Pharmacother* 1 (2): 87-93 DOI 10.4103/0976-500X.72350
- Russell W y Burch R (1959): *The Principles of Humane Experimental Technique*. London: Methuen & Co. Limited. 252 pp ISBN: 0-900767-78-2
- Shim H. (2017): Antibody Phage Display. *Adv Exp Med Biol.*;1053:21-34. Doi: 10.1007/978-3-319-72077-7_2. PMID: 29549633.
- Suckow M, Danneman P, Brayton C (2001): *The laboratory mouse. Laboratory animal pocket reference*. 167 pp ISBN 0-8493-0322-2
- Teilmann AC, Madsen AN, Holts B, Has J, Rosell B, Abelson K. (2014): Physiological and Pathological Impact of Blood Sampling by Retro-Bulbar Sinus Puncture and Facial Vein Phlebotomy in Laboratory Mice. *PLoS ONE* 9(11): e113225. Doi:10.1371/journal.pone.0113222
- University of British Columbia (2007): *Animal Care Centre, SOP: Tail vein injection in the mouse and rat*.

Yllera M, Lombardero M, Camiña M (2020): Anatomía y fisiología de los animales de laboratorio. Roedores y lagomorfos. Monografías do Ibader-Serie Pecuaria. Ibader. Universidade de Santiago de Compostela. Lugo

Zuñiga J, Tuz Mari J, Milocco S, Piñeiro R (2016): Ciencia y tecnología de animales de laboratorio 682 pp McGraw-Hill Interamericana ISBN 84-486-0310-9

Sitios web

<https://bioterios.com>

<https://www.labanimalstraining.com>

<https://researchanimaltraining.com>

Capítulo VI.

Bienestar y enriquecimiento ambiental

La Ciencia del Bienestar Animal es una disciplina de muy reciente creación, y surge como forma de estudiar a los individuos sintientes. Broom define a un organismo sintiente como aquel que posee al menos alguna de las siguientes habilidades: (I) puede evaluar las acciones de otros en relación consigo mismo y con terceros, (II) recuerda sus propias acciones y sus consecuencias, (III) evalúa riesgos y beneficios, (IV) posee sentimientos y (V) tiene algún grado de conciencia (Broom 2014).

La definición de *bienestar animal* ha ido evolucionando a través del tiempo, así, por ejemplo:

1. En 1986 se define como «el estado en el cual se encuentra un animal que trata de adaptarse a su ambiente» (Broom, 1986).
2. Hacia 1988 Blood y Studdert (Blood, 1988) lo definen como «el mantenimiento de normas apropiadas de alojamiento, alimentación y cuidado general, más la prevención y el tratamiento de enfermedades».
3. También en 1988 Hurnik define el bienestar animal como «un estado o condición de armonía física y psicológica entre el organismo y su medio» (Hurnik, 1988); y un año más tarde.
4. Fraser define el bienestar animal como un concepto que comprende diferentes condiciones «ambos el físico y el psicológico (Fraser, 1989), que normalmente coexisten. El bienestar físico se manifiesta por un buen estado de salud. El bienestar psicológico se refleja, por su parte, en el bienestar del comportamiento. Este último es evidente en la presencia de comportamiento normal y la ausencia de comportamiento considerablemente anormal». La American Veterinary Medical Association (AVMA) amplía este concepto para incluir «todos los aspectos de bienestar animal, incluyendo el alojamiento apropiado, el manejo, la alimentación, el tratamiento y la prevención de enfermedades, el cuidado responsable, la manipulación humanitaria y, cuando fuese necesaria, la eutanasia humanitaria» (Anon, 1990).
5. Más recientemente Maschi opina que, sin embargo, el bienestar animal no es un fenómeno único, y no existe una definición que satisfaga a todos (Maschi, 2017).

El bienestar animal constituye hoy día una línea de investigación teórica y experimental dentro de las ciencias de la salud. Una línea de investigación cuyos objetivos no pretenden sustituir el actual debate social sobre los derechos e intereses de los animales o la obligación moral de los seres humanos hacia ellos, ni siquiera imponer una legislación sobre su protección y conservación, sino intentar que ese debate y esa legislación se apoyen en el conocimiento científico (Mateos, 2003).

Muchas veces el término «bienestar» se confunde o aplica como sinónimo de «estar bien» lo cual no es correcto. «Estar bien» debería relacionarse con la calidad de vida del animal en el corto plazo, mientras que «bienestar» es lo indicado a largo plazo (Maschi, 2017), recordando además la definición sensible escrita por Hollands: »Esto entonces es mi definición del bienestar animal: acordar a los

animales la dignidad natural que merecen como seres vivos y sensibles» (Hollands, 1980).

De tal forma que cuando hablamos de bienestar animal nos referimos al estado de los animales y no al cuidado en sí mismo, ni a la responsabilidad del hombre con las otras especies (Zuñiga, 2001). El consenso general actual determina que el bienestar no se garantiza solo por la ausencia de experiencias negativas, sino también por la posibilidad de experimentar al menos algunas situaciones placenteras (Boissy, 2007).

En el caso del bienestar de los animales de laboratorio se incluyen dos aspectos principales: su cría o mantenimiento y su manejo durante procedimientos experimentales.

En el mantenimiento de animales de laboratorio, debe considerarse la estandarización y eliminación de factores de confusión tales como patógenos que son los principales principios que aseguran la fiabilidad científica de los experimentos.

El ambiente del animal tiene componentes físicos, químicos y biológicos. Cada elemento puede afectar positiva o negativamente al bienestar del animal en un grado significativo, ya sea de forma independiente o en combinación (Bayne, 2014). El alojamiento y la cría tienen un gran impacto en el animal de laboratorio a lo largo de su vida, no solo durante, sino también antes y después del experimento (Baumans, 2005b). El ambiente de los animales de laboratorio es bastante restringido ya que deben comer una

determinada dieta estandarizada, vivir sobre un mismo material utilizado como cama, con un ritmo circadiano constante determinado por el investigador, sometidos a un alto nivel de producción, etc., y en instalaciones con muy alto control sanitario. Como el animal de laboratorio normalmente pasa la mayor parte de su vida en un recinto primario (microambiente) mantenido en un recinto secundario muy estandarizado (macroambiente), es necesario garantizar que el entorno tenga un impacto negativo mínimo en el bienestar animal y, de hecho, lo promueva (Bayne, 2014).

Evaluación del bienestar animal

Asumiendo la obligación moral de asegurar el bienestar de los animales, se necesitan formas de evaluarlo. No se ha llegado a consenso sobre este punto (Sorensen, 2007), y el bienestar animal, en particular de los animales de laboratorio, ha sido objeto de abundante reflexión, de modo que han surgido sucesivamente varias teorías filosóficas al respecto. Estas han hecho énfasis en la satisfacción de las preferencias del animal (Jensen, 1997); en la presencia de estados mentales placenteros duraderos y en la ausencia de estados mentales desagradables (Appleby, 2002) y en la capacidad del animal de expresar su naturaleza específica (Rollin, 1989). Un buen funcionamiento biológico es lo central en los métodos de evaluación del bienestar (McGlone, 1993). Este autor sugiere que «un animal está en un estado de pobre bienestar solo cuando sus sistemas fisiológicos están alterados al punto de que se daña

su vida o su reproducción». Otra teoría, enfatiza que el buen funcionamiento biológico indica que el bienestar es el estado que refleja los intentos del animal de manejarse en su ambiente (Broom, 1986). Se tiende al consenso de que la evaluación exacta del bienestar animal debe basarse en una mezcla de estas diferentes teorías.

La evaluación del bienestar animal es por lo tanto complicada, debido a que no nos permite obtener una respuesta directa de la misma. La interpretación de indicadores fisiológicos no siempre es sencilla de realizar, ya que situaciones que muy probablemente produzcan estados afectivos opuestos pueden desencadenar la misma respuesta fisiológica. En este sentido, pareciera que al menos algunos indicadores fisiológicos (tales como los glucocorticoides que se desencadenan ante una situación que conlleve un aumento del gasto energético) representan más un indicador de la activación del sistema que de su valencia (o sea, si el animal los percibe como si fuesen positivos o negativos) (Resasco, 2018)

Webster describe cinco libertades que relacionan todas las teorías del bienestar animal antes mencionadas (Webster, 2001):

- libertad del hambre y la sed: se debe asegurar el acceso a agua y dieta adecuada para la especie;
- libertad de incomodidades: propender a que la especie tenga un ambiente adecuado;

- libertad de dolor, sufrimiento y enfermedades: prevenir, diagnosticar y tratar cualquier dolor o sufrimiento que presente el animal;
- libertad del miedo y de la angustia: asegurar a la especie un entorno no agresivo, y
- libertad para cumplir con patrones esenciales de comportamiento: aportar espacio y condiciones suficientes para ello.

Todas las teorías están sujetas a la debilidad que constituye la interpretación del estado de bienestar de un animal desde la perspectiva humana, sin embargo, varias dimensiones prácticas pueden afectar el bienestar de los animales de experimentación: infecciones, alojamiento, agua y comida u otro tipo de estrés.

Se han establecido distintos marcos regulatorios tanto para garantizar la calidad de la experimentación biomédica como para evitar el sufrimiento de los animales que se encuentran bajo nuestro cuidado (Fraser, 2008). De esta forma diferentes países fueron adoptando normas referidas al uso de animales de laboratorio. Ejemplos de ello son la Unión Europea y el Consejo Canadiense de Protección Animal (CCAC) quienes han publicado recientemente sus lineamientos para la evaluación del bienestar animal (Guillen 2018; CCAC 2021). Estos lineamientos destacan tres ejes en su evaluación: comportamiento, salud y parámetros fisiológicos a ser obtenidos por métodos que pueden ser más invasivos.

A pesar de las regulaciones existentes, podríamos preguntarnos específicamente: ¿Por qué deberíamos preocuparnos por el bienestar de los animales de experimentación? Jeremy Bentham fue uno de los primeros que se aproximó a responder cuando postuló su famosa frase: «La pregunta no es... ¿pueden razonar? O ¿pueden hablar?, sino, ¿pueden sufrir?» (Bentham, 1789); dejando así plasmada la importancia del estudio del bienestar animal.

La evaluación del bienestar es un problema complejo y se han adoptado varios enfoques para intentar resolverlo. La duda es si los animales están física y psicológicamente sanos y si obtienen lo que quieren (por ejemplo, ¿necesitan o quieren más espacio y su salud mejorará si se les proporciona más espacio?). Con respecto a la salud, las señales de alerta temprana son obviamente importantes. Las necesidades se pueden definir como requisitos, fundamentales en la biología del animal, para obtener un recurso particular o responder a un estímulo ambiental o corporal particular, mientras que “querer” se relaciona con una motivación incentivada (Baumans, 2005b).

Evaluar el dolor y la angustia en los animales es problemático, ya que puede ser subjetivo y estar basado en suposiciones antropomórficas de que las cosas que son angustiantes para los humanos también lo serán para los animales, lo cual no es necesariamente el caso (Wolfensohn, 1999).

Conceptos básicos

Existen conceptos básicos que debemos conocer cuando se habla de «Bienestar Animal» (Zuñiga, 2001), como son:

- *Homeostasis*: estado del animal cuando se encuentra en armonía consigo mismo (conducta y fisiología) y con su entorno. Esto implica que los aspectos fisiológicos (temperatura corporal, glucosa en sangre, contenido de agua en el cuerpo etc.), y los del ambiente (por ejemplo, posición que ocupa en un grupo social. Etc.), se mantienen en nivel constante o al menos predecible durante un cierto período. Un animal puede mantener su homeostasis cuando es capaz de conservar su situación actual, cuando cuenta con medidas conductuales y fisiológicas necesarias para normalizar la situación. Cuando el animal es incapaz de mantener su homeostasis por un período prolongado, desarrolla estrés que puede manifestarse en forma de conducta anormal o enfermedad.
- *Estrés*: se define como alteración de la homeostasis del animal en condiciones extremas equivalente a sufrimiento, o también como incapacidad prolongada para dominar una fuente de peligro potencial, que lleva a la activación de un sistema de emergencia frente al peligro. El estrés puede ser agudo cuando disminuye de forma repentina la capacidad de predicción o de control de cambios ambientales relevantes, o crónico: cuando los aspectos ambientales

son escasamente predecibles o controlables por largo tiempo. En el caso de estrés crónico se pueden desarrollar comportamientos anormales tales como:

- Conductas *estereotipadas*: son comportamientos repetidos de patrones simples como, por ejemplo, movimientos en círculos o saltos constantes dentro de la caja que parecen no tener sentido; generalmente se presentan en animales aislados en su caja. Estos movimientos parecen no tener un fin específico y son característicos de cada especie.
- *Comportamientos deletéreos*: son conductas que conllevan un efecto adverso sobre el propio individuo o los que conviven con él, provocando desde traumatismo hasta la muerte.
- *Distrés*: angustia o estrés intenso. El animal debe realizar esfuerzo sustancial o desarrollar respuestas adaptativas extremas ante cambios del ambiente.
- *Dolor*: experiencia sensorial aversiva que produce acciones motoras protectoras. Cambios evidentes en la conducta. No siempre es evidente y el uso de criterios fisiológicos para reconocerlo es casi inviable. El sufrimiento de un animal indica que su adaptación al ambiente no es satisfactoria.
- *Sufrimiento*: estado «mental» que resulta del dolor o del distrés, de intensidad y duración

importantes y cuando el animal no puede tolerarlos a largo plazo.

- *Bienestar*: ausencia de efectos negativos o su disminución teniendo en cuenta los efectos positivos como enriquecimiento del entorno.

Enriquecimiento ambiental

El término *enriquecimiento ambiental* (EA) se refiere a mejoras en las condiciones de confinamiento de los animales de laboratorio en comparación con los alojados de una manera estándar (Sampedro, 2017). Consiste en una amplia gama de adiciones o modificaciones al ambiente y que se utilizan para ofrecer a los animales una vida más variada. El enriquecimiento del ambiente donde se encuentra el animal puede centrarse tanto en el nivel social (interlocutores sociales, incluidos los seres humanos) como en el ambiente físico en él se incluyen los estímulos sensoriales (auditivos, visuales, olfativos y táctiles) y los aspectos nutricionales (suministro y tipo de alimento) (Baumans, 2005b).

En 1959, Russell y Burch ya consideraban el enriquecimiento como una necesidad ética en el ambiente de los animales de laboratorio, con el objetivo de refinar tanto la producción como la experimentación (Neves, 2013).

Una de las posibles formas de mejorar las condiciones de vida de los animales de laboratorio consiste en brindarles la oportunidad de realizar repertorios

de comportamiento más específicos de la especie a través del EA. Es decir, cualquier modificación en el ambiente de los animales en cautiverio que busque mejorar su bienestar físico y psicológico, proporcionando estímulos que satisfagan las necesidades específicas de su especie (Baumans 2005b; Meikle 2020).

El cuidado tradicional y el mantenimiento de los animales de laboratorio no necesariamente incluye necesidades propias de la especie en relación con su entorno y mucho menos tiene en cuenta la variabilidad de las cepas (Baumans, 2005a y 2005b).

En la década del 70, el concepto de enriquecimiento fue introducido en los zoológicos y gradualmente comenzó a utilizarse en los bioterios (Baumans 2005b; Neves 2013). Los animales de laboratorio presentan características propias de su comportamiento además de las provenientes de sus ancestros salvajes. Podemos mencionar: socialización, búsqueda de alimentos, hábitos de higiene, protección de depredadores, etc. Y su performance aumenta si se encuentran en un ambiente enriquecido. Hebb (1947) mostraba que las ratas criadas como mascotas se desempeñaban mejor resolviendo problemas que las criadas en cajas.

El interés por investigaciones en animales con enriquecimiento ambiental ha aumentado ya que se ha observado que la recuperación de pacientes que han sufrido accidentes cerebro vasculares depende de factores socioambientales (McDonalds, 2018).

Tipos de enriquecimiento ambiental

El enriquecimiento del ambiente donde se encuentra el animal puede centrarse tanto en el ambiente social (interlocutores sociales, incluidos los seres humanos) como en el ambiente físico que consta de estímulos sensoriales (auditivos, visuales, olfativos y táctiles) y aspectos nutricionales (suministro y tipo de alimento) (Baumans 2005b; Winncker 2012; Neves 2013). La Guía Canadiense sobre el cuidado de animales de laboratorio (CCAC, 2021b) incluye una sección sobre este tema, enfocada a varias especies, incluidas las de animales tradicionales de experimentación.

- a. *Enriquecimiento social*: incluye la socialización de los animales con sus conespecíficos y con los seres humanos. Estos últimos hacen parte del enriquecimiento social de los animales de laboratorio dado que su manipulación es un aspecto importante en la rutina diaria (Neves, 2013).
- b. *Enriquecimiento físico*: incluye condiciones tales como cajas de mayor tamaño que contienen objetos y diferentes espacios que facilitan el ejercicio, el juego, la exploración, permitiendo a los animales mayor control sobre su entorno. Se puede también aumentar el número de animales por caja, favoreciendo interacciones constantes e imprevisibles, pero siempre respetando las necesidades de espacio de cada especie como se mencionó en el capítulo IV.

Los animales presentan comportamientos diferentes según estén aislados o en grupo. Así, por ejemplo,

la agresividad de animales en grupos puede modificarse ajustando la complejidad del ambiente, como colocando barreras visuales que permiten al animal elegir los momentos de socialización. También se pueden generar oportunidades de ocupación del tiempo durante las horas de vigilia posibilitando la búsqueda del alimento, el acopio de elementos para anidar, el juego y la exploración. Dentro del equipamiento de la caja, el material para construir nidos permite al animal interactuar con su ambiente. El comportamiento exploratorio y las oportunidades y estructuras donde hacer ejercicio en roedores jóvenes resultan muy importantes en su rutina diaria. La mayoría de los animales además necesitan un lugar para esconderse tanto de otros, como del personal del lugar y de los ruidos.

Los efectos del EA dependerán del tipo de enriquecimiento utilizado. En el campo de la neurociencia, el enriquecimiento se refiere principalmente a la vida social en una jaula grande y compleja que contiene diferentes juguetes que se cambian con frecuencia para inducir cambios en el cerebro y el comportamiento. En la investigación sobre el bienestar animal, el enriquecimiento se centra en necesidades específicas como la construcción de nidos, el escondite y el roer, con el fin de mejorar el bienestar de los animales (Baumans, 2005b).

Con relación a su influencia sobre los resultados de investigación, no se puede considerar al EA simplemente como un refinamiento. La estimulación social en ratas no solo genera mayor espesor de corteza cerebral con más conexiones neurales; sino que genera

cambios orgánicos: así, por ejemplo, el crecimiento tumoral en ratones aislados es más rápido que los que se encuentran en grupos estables en la caja y el aislamiento también aumenta la toxicidad de algunos fármacos, por lo que surge la pregunta: «¿Los animales enriquecidos muestran más variabilidad en su respuesta a los procedimientos experimentales porque muestran comportamientos más diversos?». Según Baumans (2005b) existen dos posiciones al respecto:

Algunos investigadores creen que sí. En entornos complejos, por ejemplo, los animales no solo responden a un estímulo, sino a muchos estímulos variables a la vez, y esto puede resultar en una mayor variación entre los sujetos.

El contraargumento es que debido a que un animal puede desplegar mejor su comportamiento especie-específico en entornos enriquecidos, y puede entonces ser capaz de hacer frente mejor a cambios nuevos e inesperados mostrando una respuesta más uniforme. Si, por tanto, es probable que los animales en ambientes enriquecidos sean fisiológica y psicológicamente más estables, se puede deducir que pueden considerarse modelos más refinados y, por tanto, garantizar mejores resultados científicos. En la práctica, sin embargo, los resultados de diferentes estudios parecen indicar que los efectos del enriquecimiento sobre la variabilidad de los resultados dependen del parámetro que se mida, la cepa del animal y el tipo de EA.

El EA es beneficioso a todas las edades. Por esta razón debe considerársele como una variable de un experimento y se debe tener en cuenta. Es importante no cambiar el ambiente de un animal durante los experimentos sin acordar con el investigador principal y si se hacen cambios, hacerlos a todos los animales del estudio. Además, es muy importante describir detalladamente el tipo de enriquecimiento en la sección «Materiales y Métodos» de las publicaciones científicas para asegurar la reproducibilidad de los resultados experimentales. Solo entonces se pueden definir y medir con precisión los controles y las variables del experimento científico (Baumans, 2005b).

Hay variadas consideraciones para garantizar la seguridad animal y su satisfacción relativa; es importante además considerar que las necesidades ambientales no permanecen estáticas a lo largo de la vida de los animales, sino que se pueden ajustar en función de la edad, la especie, la cepa, las necesidades individuales y los requisitos de investigación (Bayne 2014; Grimm 2020).

Siempre debemos de tener en cuenta que el EA no es «un juguete», sino una oportunidad para: «socializar o no»; «hacer y modificar»; «esconderse o refugiarse»; para hacer ejercicio físico; etc.

El bienestar y enriquecimiento ambiental según las especies

Ratas y ratones

Son especies cosmopolitas, comensales con el hombre y altamente adaptables a variadas condiciones ambientales. Como la mayoría de los roedores son de hábitos nocturnos, con un claro ritmo circadiano con picos de actividad durante el período de oscuridad. Presentan activo comportamiento exploratorio, trepan y en la naturaleza pasan mucho tiempo procurando alimento. Construyen elaborados nidos y túneles y forman estructuras sociales complejas. Todos estos comportamientos se conservan en la rata y ratón de laboratorio e intentar suprimirlos puede conducir a sufrimiento y frustración provocando comportamientos estereotipados (Gentsch 1981; Dawkins 1990; Holson 1991; Sherwin 2000; Würbel 1996).

Después de vivir varias generaciones bajo condiciones de laboratorio, estos animales se han adaptado al ambiente y difieren de los salvajes en sus necesidades ambientales y de comportamiento (Inglis, 1999) aunque conservan algunas necesidades tales como la de sitio de descanso protegido de depredadores (Hurst, 1999). Particularmente las ratas presentan una gran capacidad de adaptación, y su uso continuado en laboratorios ha llevado a que sean animales muy tolerantes a diferentes tipos de manipulaciones (Weihe, 1987).

En la mayoría de los bioterios, tras el destete son alojados con separación por sexos. Dado que son animales sociales, el alojamiento individual suele causar estrés excesivo por lo que su aislamiento no es recomendable. El alojamiento grupal para estos animales sociales es a menudo una opción de «enriquecimiento social» efectiva y relativamente simple debido a la estimulación mental compleja y variada que proporciona, la importancia del apoyo social para hacer frente a los factores estresantes y la necesidad conductual inherente de muchas especies para el contacto social (Gentsch 1981; Holson 1991; Winncker 2012; Neves 2013; Pritchett-Corning, 2015). Ya en 1960, comparando el comportamiento de ratas aisladas en cajas con el de otras en grupos a las que se había incluido juguetes tales como escaleras, túneles y ruedas, Krech (1960), demostró que el enriquecimiento influía sobre el número de sinapsis, la concentración de acetilcolina y la actividad de la acetilcolinesterasa cerebral. Además de los cambios químicos como consecuencia del EA, se han demostrado cambios anatómicos: incremento del espesor de la corteza cerebral, con mayor número de sinapsis y células gliales (Rosenzweig, 1962). Estos cambios pueden ocurrir a cualquier edad, aunque los incrementos son mayores a las edades más tempranas.

En muchos casos los ratones macho forman grupos estables por establecimiento de jerarquías, pudiendo existir luchas entre ellos hasta su establecimiento, por lo que es importante formar grupos al momento del destete y no cuando son adultos (Neves, 2013). En el caso de los ratones, los niveles de agresión varían con las diferentes cepas (Nevison, 1999), por

ejemplo, para machos BALB/c lo óptimo son grupos de tres animales (Van Loo, 2001b); en esta línea las agresiones para definir jerarquías en machos adultos pueden ocasionar heridas en la zona lumbar y en la cola (Neves 2013; Lidster 2019). En el caso de las ratas es raro observar agresión, puede darse en machos adultos cuando se juntan individuos provenientes de jaulas diferentes; al igual que lo que ocurre en los ratones, depende del tipo de cepa con el que se trabaje (Neves, 2013). Las hembras de ratas y ratones pueden ser alojadas juntas en cualquier edad sin que ocurran agresiones, aunque provengan de jaulas diferentes o hayan sido utilizadas como reproductoras. Las hembras únicamente se muestran agresivas cuando defienden sus crías (Neves, 2013)

De acuerdo con Poole (1992), los mamíferos y las ratas en particular precisan de los siguientes requerimientos ambientales para cumplir sus necesidades:

1. estabilidad y seguridad;
2. complejidad apropiada;
3. algo de impredecibilidad, y
4. oportunidades para alcanzar objetivos.

A pesar de que las ratas y los ratones se han adaptado muy bien a la vida en el bioterio todavía muestran similitudes con sus ancestros salvajes y por eso el ambiente debe satisfacer necesidades fisiológicas y de comportamiento, tales como el descanso, la construcción de nido, de escondite, exploración,



Fig. 37a: Enriquecimiento con material de descarte en el Laboratorio de Experimentación Animal de Fac. de Química, Udelar (Foto Dra. Jenny C Saldaña)



Fig. 37b: Enriquecimiento con material de descarte (adaptado de Neves, 2013)

recolectar alimento, roer y tener contactos sociales, etc. Por ejemplo, en las ratas el tamaño de las cajas se tiende a agrandar y aumentar la altura de las cajas de modo que el animal pueda girar y pararse sobre sus patas traseras además de que se pueda incorporar a la caja elementos de enriquecimiento.

Estos animales tienen muy desarrollado el sentido de la audición, olfato y tacto (Hurst, 1999) y poseen una pobre visión (Jacobs, 2001) (ver Cap. IV). Su sentido de audición responde a un amplio rango de secuencias ultrasónicas (ver Cap. IV); algunos equipos de laboratorio emiten sonidos en frecuencias que son audibles por los animales lo que seguramente afectará su bienestar (Voipio 1997; Jennings 1998; Koolhaas 1999; Barnett 2001; Neves 2013). Emiten vocalizaciones ultrasónicas inaudibles para el humano que son utilizadas en la comunicación sexual y entre la hembra y las crías; aunque también emiten sonidos que pueden ser escuchados por el hombre por ejemplo los emitidos durante las agresiones (Neves, 2013).

El olfato está altamente desarrollado, y es utilizado para detectar alimentos, predadores y para obtener información social (Nevison, 1999). La necesaria limpieza rutinaria de cajas puede eliminar claves olfativas y perturbar la jerarquía social de los animales, originando picos de agresión entre machos cuando se realiza el cambio de camas. Se recomienda que al hacer el cambio de las cajas se coloque una pequeña porción de la cama sucia en la nueva caja y de esa forma disminuye considerablemente la agresión (Winncker, 2012).



Fig. 38: Enrichimiento con material comercializado (adaptado de www.bio-serv.com)



Fig. 39: Material para construcción de nido (adaptado de www.bioterios.com)

Existen diferentes tipos de enriquecimiento que pueden ser improvisados con material de descarte o que se puede adquirir a bajo costo (rollos de cartón, caños plásticos, cofias descartables, papel, etc.) (Figs. 37a, 37b y 38); todo el material que se utilice se debe esterilizar antes de colocarlo en la caja con los animales. En cuanto a los diferentes tipos de enriquecimiento ocupacional en estas dos especies es importante el aportar material para realizar nido, los ratones lo prefieren siempre en el transcurso de su vida, mientras que las ratas solo cuando están por parir sus crías (Winncker 2012; Neves 2013) (Fig. 39). El material para el nido además le servirá para regular la temperatura y esconderse de sus conespecíficos evitando ser agredidos y de esa forma controlar el ambiente.

Ratas y ratones son roedores por lo que sus incisivos continúan creciendo a lo largo de su vida, es así que la provisión de elementos duros para roer es esencial para evitar el crecimiento excesivo de sus dientes. Se debe considerar la inclusión de bloques de madera o palitos para masticar, siendo otra forma de enriquecer el ambiente en este caso el enriquecimiento será nutricional (<https://www.nc3rs.org.uk>)

Cobayos

Es una especie que como consecuencia de la domesticación adquirió algunas características diferentes, tanto en su comportamiento (con menor agresividad

y actitud exploratoria), como en su biología, (con mayor peso corporal).

Su patrón de organización social es dependiente del número de integrantes del grupo, portan algunas características provenientes de la especie salvaje, como el comportamiento social formando harenes con un macho dominante.

Su visión les permite distinguir colores (Jacobs, 1994). Su intervalo auditivo es más amplio que el humano, desplazado hacia altas frecuencias. El olfato es muy importante para su comportamiento social (ver cap. IV).

Los grados de stress y bienestar de los cobayos pueden determinarse a partir de: 1) su apariencia general, 2) cambios en el peso corporal, 3) su comportamiento y 4) parámetros fisiológicos (Broom, 1993).

El enriquecimiento ambiental más importante para los cobayos se obtiene al formar parte de un grupo social. Como mínimo, los animales deben alojarse en parejas y, sin una justificación excepcional, no se debe permitir el alojamiento individual de animales. Si se considera necesario un alojamiento único, el animal debe permanecer en contacto visual y olfativo con sus compañeros de jaula y el período de aislamiento debe reducirse al mínimo absoluto (<https://www.nc3rs.org.uk>).

Los cobayos tienen una gran necesidad de esconderse, su sensación de seguridad depende del acceso a un refugio cubierto, por ejemplo; los tubos de PVC

(Fig. 40) proporcionan excelentes refugios y son un punto focal de atracción constante para ellos (Banjanin 2004; Donnelly 2015). Tienden a mantenerse en los bordes de la jaula o de las paredes del corral, ya que instintivamente evitan las superficies abiertas que los expondrían a potenciales depredadores; (White, 1989), el utilizar enriquecimiento como el mencionado evita este comportamiento.

Son animales que no sintetizan vitamina C, el suministrarles frutas o verduras es una forma sencilla de satisfacer esta necesidad, además de ser una importante forma de enriquecimiento (Fig. 41). Si además se les da directamente con la mano, es una forma positiva de fomentar la relación entre el cuidador/ investigador y el animal (Home Office, 2014). El suministrarle vegetales verdes como alimento, además de complementar su dieta habitual fomenta comportamientos naturales de alimentación y pastoreo. La falta de material forrajero puede resultar en estereotipias como la tricofagia (comer pelo de forma compulsiva). El vegetal verde utilizado debe ser de buena calidad y lo suficientemente suave para evitar el riesgo de daño ocular a los animales (Gerold 1997; Banjanin 2004; Donnelly 2015).

Conejos

En esta especie la interacción con el personal es muy importante, ya que tienen la capacidad de generar

vínculos, se requiere paciencia y entrenamiento para lograrlo.

El conejo es un animal principalmente nocturno. Si se les mantiene aislados en pequeñas cajas desarrollan comportamientos estereotipados. Los conejos se alojan en sitios donde existen o se reproducen los cambios de luz y oscuridad naturales, y son sensibles a la luz intensa que puede causarles daño en la retina.

Tradicionalmente, los conejos mantenidos en laboratorios se alojan en jaulas individuales; cuando el alojamiento se realiza por mucho tiempo, es conveniente que las jaulas les permitan ver a su alrededor y a otros individuos (Stauffacher, 1994). La especie es naturalmente gregaria y el mantenerla socialmente aislada, se ha debido al problema de agresión entre animales no compatibles. La separación de sus congéneres en un entorno árido les impide realizar comportamientos naturales como excavar, acicalarse y algunas otras actividades locomotoras. También reduce su exposición a variaciones de olores. Estas acciones pueden conducir al desarrollo de comportamientos estereotipados, por ejemplo, frotarse de forma excesiva en la pared o roer los bordes o barras de la jaula. El comportamiento estereotipado parece ser más frecuente por la noche cuando los conejos son más activos. Se ha demostrado que el aislamiento social induce signos fisiológicos de estrés y los conejos enjaulados individualmente también pueden mostrar signos de inquietud y aburrimiento (Podberscek, 1991). También desarrollan trastornos intestinales y se ha demostrado que la limitada libertad de



Fig. 40: Enriquecimiento con tubos de PVC utilizado en el campo experimental, Fac. de Medicina, Udelar (Foto Dra. Jenny C Saldaña)



Fig. 41: Enriquecimiento en Cobayos (adaptado de Donnelly, 2015)

movimiento produce cambios en los músculos, huesos y articulaciones (<https://www.nc3rs.org.uk>).

Si bien las cajas plásticas son transparentes el conejo solo puede observar a sus congéneres, actualmente varios fabricantes de jaulas las fabrican con divisiones perforadas para permitir además el contacto olfativo y físico limitado, que puede ser más valioso que el contacto visual para los conejos (Lofgren, 2015).

Siempre que sea posible, los conejos deben mantenerse en corrales en grupos sociales para satisfacer sus necesidades de comportamiento social y ejercicio. Los conejos en grupo son más activos y muestran menos estereotipias que los mantenidos en jaulas además de expresar un repertorio conductual más amplio (Trocino 2006; Verga 2007; Hawkins 2008; Lofgren 2015) (Fig. 42).

Al proporcionar EA, se puede reducir la cantidad de comportamientos anormales. El enriquecimiento adecuado incluye paja, heno, palos para masticar, cajas de cartón, áreas elevadas (Hawkins 2008; Lidfors 2010). Un espejo en la jaula también puede mejorar el bienestar de los conejos (Jones 2005; Dalle Zotte 2009). Si se utilizan jaulas, es ideal proporcionar un área elevada o un estante, ya que reduce los comportamientos anormales y las respuestas nerviosas cuando se manipulan los animales. Agrega estructura a la jaula y permite que los conejos se muevan de manera que mantengan la función normal y la estructura de músculos, huesos y articulaciones (<https://www.nc3rs.org.uk>). El estante proporciona un área más oscura y funciona como un escondite importante

de la luz intensa, que como ya mencionamos puede causar daño a la retina en los animales albinos. Sacar de la jaula a los conejos machos alojados individualmente y dejarlos correr en un corral de piso con diferentes objetos también puede ser un enriquecimiento, ya que se les proporciona un cambio de ambiente, olores de otros conejos machos que estimulan las marcas de olor y la oportunidad de moverse y un área más grande, que puede ayudar a reducir la obesidad (Knutsson, 2011). Como los conejos se paran sobre sus patas traseras para inspeccionar su entorno, las jaulas deben ser lo suficientemente altas para adaptarse fácilmente a este comportamiento. Una superficie sólida en la base de jaulas con rejilla les permite apoyarse sin daño por el peso. Si bien proporcionar cajas y plataformas elevadas para trepar aumenta la complejidad de la jaula y aborda la necesidad de ver el entorno, no necesariamente permite que el conejo se pare completamente erguido (Lofgren, 2015) (Fig. 42).

En cuanto al enriquecimiento en el manejo de los conejos, el manejo diario puede ayudar a prevenir lesiones debidas a la manipulación, especialmente en la columna y patas traseras. Algunos estudios han sugerido que el manejo temprano en la vida puede hacer que los conejos adultos sean más susceptibles de ser manipulados (Verga, 2007)



Fig. 42: Conejos estabulados en grupo (adaptado de <https://nc3rs.org.uk/housing-and-husbandry-rabbits>)

Bibliografía

- Anon (1990): Animal Welfare Committee looks animal rights. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196 (1): 17
- Appleby MC, Sandøe P (2002): Philosophical debate on the nature of well-being: Implications for animal welfare. *Anim Welf*; 11:283-294.
- Banjanin S, Barley J, Bell L, Cunneen M, Johnston H, Quintero I, Weilemann R, Reinhardt V (2004): Environmental Enrichment for Guinea Pigs: A Discussion by the Laboratory Animal Refinement & Enrichment Forum. *Animal Technology and Welfare* 3(3), 161-163
- Barnett SW. (2001): Introduction to Animal Technology. 2nd edition, Blackwell Science Ltd.
- Batchelor GR. (1999): The laboratory rabbit. In *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*, 7th edition. Poole T ed, Blackwell Science, Oxford; 395-408.
- Baumans V, Brain PE, Brugère H, Clausing P, Jeneskog T, Perretta G. (1994): Report of the FELASA Working Group on Pain and Distress. *Lab Anim*; 28:97-112.
- Baumans, V.-(2005a): Environmental Enrichment for Laboratory Rodents and Rabbits: Requirements of Rodents, Rabbits, and Research. *ILAR Journal* V46 N° 2, 162- 170.
- Baumans V (2005b): Science-based assessment of animal welfare: laboratory animals *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 24 (2), 503-514
- Bayne K., Würbel H (2014): The impact of environmental enrichment on the outcome variability and scientific validity of laboratory animal studies *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.*, 33 (1), 273-280.
- Bayne K, Turner P (2014): Animal Environments and Their Impact on Laboratory Animal Welfare. *Laboratory Animal Welfare* Cap 7 pag 77-93 <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-385103-1.00007-5>
- Bentham J. (1789): *An Introduction to the Principles of Morals and Legislation*. Oxford, Clarendon Press
- BlodD, Student V (1988): *Bailliere's comprehensive veterinary dictionary*. London: Bailliere Tindall, vol 51, 984 ISBN 0-7021-1195-9
- Boissy A, Manteuffel G, Jensen MB, Moe RO, Spruijt B, Keeling LJ, Winckler C, Forkman B, Dimitrov I, Langbein J, Bakken M, Veissier I, Aubert A. (2007): Assessment of positive emotions in animals to improve their welfare. *Physiol Behav*: 92: 375-397.
- Briese E. (1998): Normal body temperature of rats: the setpoint controversy. *Neurosci Biobehav Rew*; 22(3):427-436.
- Broom DM. (1986): Indicators of poor welfare. *Br Vet J*; 142:524-526
- Broom DM, Johnson KG. (1993): *Stress and Animal Welfare*. Chapman and Hall, London
- Broom DM. (1996): Animal welfare defined in terms of attempts to cope with the environment. *Acta Agric Scand Section A-Animal Science*; 27(Suppl):22-28
- Broom DM. (2014): *Sentience and Animal Welfare*, First Edition. Oxfordshire, Reino Unido, CABI
- CCAC (Canadian Council on Animal Care) (2021): CCAC guidelines: Animal welfare assessment. <http://www.ccac.ca>
- CCAC (Canadian Council on Animal Care) (2021b): <https://ccac.ca/en/training/modules/animals-housed-in-vivaria-stream/environmental-enrichment.html>,

- Dalle Zotte E, Princz Z, Matics Zs et al. (2009): Rabbit preference for cages and pens with or without mirrors. *Applied Animal Behaviour Science* 116: 273-278.
- Dawkins MS. (1990): From an animal's point of view: Motivation, fitness and animal welfare. *Behav Brain Sci*; 13:1-9
- Donnelly M (2015): Guinea Pigs. In *Comfortable quarters for laboratory animals*. Animal Welfare Institute. Ed C Liss, D Tilford, V Reinhardt. 252 pp ISBN 978-0-938414-79-7
- Fraser, A. (1989): Welfare and well-being (letters). *Veterinary Record* 125(12): 332-3
- Fraser D. (2008): *Understanding Animal Welfare: The Science in its Cultural Context*. Ames, Iowa, Wiley-Blackwell
- Gentsch C, Lichtsteiner M, Feer H. (1981): Locomotor activity, defecation score and corticosterone levels during an open-field exposure: A comparison among individually and group-housed rats, and genetically selected rat lines. *Physiol Behav*; 27:183-186
- Gerold S, Huisinga E, Iglauer F, Kurzawa A, Morankic A, Reimers S. (1997): Influence of feeding hay on the alopecia of breeding guinea pigs. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 44(1 10), 341-348. Doi:10.1111/j.1439-0442.1997.tb01118.x
- Grimm JW, Sauter, F (2020): Environmental enrichment reduces food seeking and taking in rats: A review. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 190 172874
- Guide to the Care and Use of Experimental Animals (1993): Volume 1, 2nd Edition. Canadian Council on Animal Care -Conseil canadien de protection des animaux. Revision 2003
- Guillen J, Prins J, HowardB, Degryse A, Gyger M (2018): The European Framework on Research Animal Welfare Regulations and Guidelines. In *Laboratory Animals (second Edition): Regulations and Recommendations for the Care and Use of Animals in Research*, Cap 5: 117-202. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-849880-4.00005-2>
- GV-SOLAS (1988): *Planung und Struktur von Versuchstierbereichen tierexperimentell tatiger Institutionen* 4th edn. Biberach: Gesellschaft für Versuchstierkunde, Society for Laboratory Animal Science
- Hebb DO (1947): The effects of early experience on problem-solving at maturity. *Am Psychol*, 2:306-307.
- Hollands, C. (1980): *Compassion is the Bugler. The Struggle for Animal Rights*. Edinburgh,
- McDonald, Hurnik, J. y Lehman, H. (1988): Ethics and farm animal welfare. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics* 1:305-318
- Harris RBS, Zhou J, Mitchell T, Hebert S, Ryan DH. (2002): Rats fed only during the light period are resistant to stress-induced weight loss. *Physiol Behav*; 76:543-550
- Hartman HA. (1974): The foetus in experimental teratology. In *The Biology of the Laboratory Rabbit*. Weisbroth SH, Flatt RE, Kraus AL eds, Academic Press, New York; 92-153
- Hawkins P, Hubrecht R, Buckwell A et al. (2008): Refining rabbit care – A resource for those working with rabbits in research. Report from the UFAW/RSPCA Rabbit Behaviour and Welfare Group. ISBN: 978-0-901098-06-1
- Holson RR, Scallet AC, Ali SF, Turner BB. (1991): «Isolation stress» revisited: Isolation-rearing effects depend on animal care methods. *Physiol Behav*; 49:1107-1118
- Home Office (2014): *Code of Practice for the Housing and Care of Animals Bred, Supplied or Used for Scientific Purposes*, Williams Lea Group London

- Hurst JL, Barnard CJ, Tolladay U, Nevison CM, West CD. (1999): Housing and welfare in laboratory rats: effects of cage stocking density and behavioural predictors of welfare. *Anim Behav*; 58:563-586
- Inglis IR, Hudson A. (1999): Wild rats and mice. In *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*, 7th edition. Poole T ed, Blackwell Science Ltd, Oxford, UK; 274-281.
- Jacobs GH, Deegan JF. (1994): Spectral sensitivity, photopigments, and color vision in the guinea pig (*Cavia porcellus*). *Behav Neurosci* 108: 993-1004
 Jacobs GH, Fenwick JA, Williams GA. Cone-based vision of rats for ultraviolet and visible lights. *J Exp Biol* 2001; 204:2439-2446
- Jennings M, Batchelor GR, Brain PF, Dick A, Elliot H, Francis RJ, Hubrecht RC, Hurst JL, Morton DB, Peters AG, Raymond R, Sales GD, Sherwin CM, West C. (1998): Refining rodent husbandry: the mouse. Report of the Rodent Refinement Working Party. *Lab Anim*; 32(3):233-259
- Jensen KK, Sandøe P. (1997): Animal welfare: Relative or absolute? *Appl Anim Behav Sci*; 54:33-37
- Jones SE, Phillips CJC (2005): The effects of mirrors on the welfare of caged rabbits. *Animal Welfare* 14: 195-202
- Kalste E and Mering S (2007): *The Welfare of Laboratory Animals*, Ed E. Kalste Springer
- Knutsson M (2011): Exercise pens as an environmental enrichment for laboratory rabbits. Student report :48 in Veterinary program, Swedish University of Agricultural Sciences, 32 pp
- Koolhaas JM. (1999): The laboratory rat: In the UFAW handbook on the care and management of laboratory animals, 7th edition. Poole T ed, Blackwell Science Ltd, Oxford, UK; 313-330
- Krech D, Rosenzweig MR, Bennett EL (1960): "Effects of environmental complexity and training on brain chemistry". *J Comp Physiol Psychol.* 53 (6): 509-19.
- Lidfors L, Edström T (2010): The laboratory rabbit. In: *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals*, Eight Edition. Hubrecht R, Kirkwood J (Ed.) Wiley-Blackwell.
- Lidster K, Owen K, Browne J, Prescott M (2019): cage aggression in group- housed laboratory male mice: an international data crowdsourcing project. *Scientific Reports* 9:15211 | <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51674-z>. www.nature.com/scientificreports/
- Lofgren J (2015): Rabbits. In *Comfortable quarters for laboratory animals*. Animal Welfare Institute. Ed C Liss, D Tilford, V Reinhardt. 252 pp ISBN 978-0-938414-79-7
- Maschi F (2017): El efecto del enriquecimiento ambiental sobre la variabilidad de parámetros fisiológicos y conductuales en ratones de laboratorio. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Veterinarias 202pp
- McDonald MW, Hayward KS, Rosbergen ICM, Jeffers MS and Corbett D (2018): Is Environmental Enrichment Ready for Clinical Application in Human Post-stroke Rehabilitation? *Front. Behav. Neurosci.* 12:135. Doi: 10.3389/fnbeh.2018.00135
- McGlone JJ. (1993): What is animal welfare? *J Agric Environ Ethics*; 6(Suppl 2):26-36
- Meikle M, Arevalo A, Schlapp G, Fernandez G, Menchaca A, Crispo M. (2020): Long-Term Effect of Environmental Enrichment on Reproductive Performance of Swiss Webster Mice and Their Female Offspring. *Animals* 10, 1438; doi:10.3390/ani10081438. www.mdpi.com/journal/animals
- Mateos Concha (2003): *Bienestar Animal Sufrimiento y Conciencia*. Universidad de Extremadura, Servicio de Publicaciones. 114 pp ISBN 84-7723-564-3

- Nevison CM, Hurst JL, Barnard CJ. (1999): Strain-specific effects of cage enrichment in male laboratory mice (*Mus musculus*). *Anim Welf*; 8:361-379
- Neves S, Mancini J, Wenzel E (2013): Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP. Sao Paulo 234 pp ISBN 978-85-85285-09-8
- Peirson S, Brown L, Potchecary C, Benson L, Fisk A (2018): Light and the laboratory mouse. *Journal of Neuroscience Methods* 300: 26-36
- Podberscek A, Blackshaw J, Beattie A (1991): The behaviour of group penned and individually caged laboratory rabbits. *Applied Animal Behaviour Science* 28: 353-363
- Poole TB. (1992): The nature and evolution of behavioural needs in mammals. *Anim Welf*; 1:203-220
- Pritchett-Corning K (2015): Rats. In: *Comfortable Quarters for Laboratory Animals* (Eds. Liss C, Litwak K, Tilford D, Reinhardt V), Animal Welfare Institute.
- Resasco A.(2018): Impactodeldesarrollo de la lineatumoral A549 en el bienestar de ratones de la cepa N:NIH(S)-Fox1nu. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Veterinarias. 161pp
- Rollin B. (1989): Animal pain. In «Animal's Rights and Human Obligations». Regan T, Singer P eds, Prentice-Hall Inc, New Jersey, US
- Rosenzweig MR, Krech D, Bennett EL, Diamond MC (1962): Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: a replication and extension. *J. Comp Physiol Psychol* 55 (4): 429-37.
- Sachser N, Künzl C and Kaiser S (2007): The welfare of laboratory guinea pigs. Norb, in *The Welfare of Laboratory Animals- E. Kaliste* (Ed.)Springer.
- Sampedro-Piquero P, Begega A (2017): Environmental Enrichment as a Positive Behavioral Intervention Across the Lifespan. *Current Neuropharmacology*, 15, 459-470.
- Sherwin CM. (2000): Frustration in laboratory mice. *Sci Cent for Anim Welf Newsl*; 22(3):7-12
- Sørensen, D.B.(2007): Animal Welfare- an introduction, Ch.1, in *The Welfare of Laboratory Animals- E. Kaliste* (Ed.)Springer.
- Spector W. (1956): *Handbook of Biological Data*. WB Saunders, Philadelphia
- Stauffacher M, Bell DJ, Schulz K-D. (1993): Rabbits. In *The accommodation of laboratory animals in accordance with animal welfare requirements*. O'Donoghue PN ed, Proc Int Workshop Bundesgesundheitsamt, Berlin 17-19 May, 1994; 15-30
- Trocino A, Xicatto G (2006): Animal welfare in reared rabbits: a review with emphasis on housing systems. *World Rabbit Science* 14: 77-93
- Van de Weerd HA, Baumans V. (1995): Environmental enrichment in rodents. In *Environmental Enrichment Information Resources for Laboratory Animals*, AWIC Resource Series No 2; 145-149
- Van Loo PLP, Mol JA, Koolhaas JM, Van Zutphen LFM, Baumans V. (2001): Modulation of aggression in male mice: influence of group size and cage size. *Physiol Behav* 2001b; 72:675-683
- Webster AJF. Farm animal welfare: the five freedoms and the free market. *Vet J* 161:229-237.
- Verga M, Luzi F, Carezzi C (2007): Effects of husbandry and management systems on physiology and behavior of farmed and laboratory rabbits. *Hormones and Behaviour* 52: 122-129

- Weihe WH (1987): The laboratory rat. In The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals. Poole T ed, Longman Scientific & Technical, London, UK; 309-330
- White W, Balk M, Lang C (1989): Use of cage space by guinea pigs. *Laboratory Animals* 23: 208-214
- Winnicker C, Gaskill B, Garner J, Pritchett K (2012): A guide to the behavior & enrichment of laboratory rodents. Published by Charles River Laboratories 107pp ISBN 978-0-9835453-3-0
- Wolfensohn, SE and Lloyd, M (1999): Practical use of distress scoring systems in the application of humane end points In: Humane endpoints. In animal experiments for biomedical research. Royal Society of Medicine Press
- Würbel H, Stauffacher M, VonHolst D (1996): Stereotypies in laboratory mice – Quantitative and qualitative description of the ontogeny of ‘wire-gnawing’ and ‘jumping’ in Zur:ICR and Zur:ICR nu. *Ethology*; 102:371-385
- Yamauchi C, Fujita S, Obara T, Ueda T. (1983): Effect of room temperature on reproduction body and organ weights, food and water intakes and hematology in mice. *Exp Anim*; 32:112
- Zuñiga J, Tuz Mari J, Milocco S, Piñeiro R (2001): *Ciencia y tecnología de animales de laboratorio* 682 pp McGraw-Hill Interamericana ISBN 84-486-0310-9

Sitios web

www.bioterios.com

<https://nc3rs.org.uk/housing-and-husbandry-rodents>

www.bio-serv.com

www.bioterios.com

Capítulo VII.

Anestesia y analgesia

Los procedimientos dolorosos realizados en animales se encuentran entre las preocupaciones públicas más emotivas sobre el bienestar animal. La forma en que los métodos de cuidado de animales provocan dolor o malestar, o reducen su capacidad para experimentar placeres normales, son áreas clave de preocupación con respecto al uso de animales y la investigación biomédica; sin embargo, conocer la vida emocional de los animales es uno de los desafíos más difíciles que enfrenta la ciencia (Weary, 2006).

El animal no es un simple instrumento pasivo de medida dentro de un determinado experimento, debemos tener presente que es un ser sintiente. El dolor provoca efectos patofisiológicos que tienen influencia sobre el bienestar, la morbilidad y la mortalidad de los animales. Si utilizamos animales sin dolor o estrés, reduciremos variables modificadoras en los resultados del experimento que estemos realizando. Por estas razones, siempre se deben identificar las causas del dolor y controlar los efectos adversos. (Stokes 2000; Rivera 2009; Jirkof 2017).

La analgesia y anestesia son técnicas comunes en experimentación animal, quienes manipulan animales con fines experimentales debe conocer sus fundamentos y las técnicas básicas utilizadas. Su conocimiento podrá asegurar un adecuado manejo del animal, y reducir molestias y posible sufrimiento por

manipulación lo que facilitará considerablemente la calidad y el trabajo del investigador.

¿Qué es el dolor?

Según la Asociación Internacional de Estudio del Dolor (IASP), el dolor es una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño tisular potencial o real, o descriptas en términos referentes a tal daño (IASP, 1979), esta definición es considerada, hasta hoy, por la OMS como la mejor definición de dolor (Vidal, 2020). Zimmermann lo define, en relación con la experimentación animal, como una experiencia sensorial aversiva que produce acciones motoras protectoras, dando como resultado el aprendizaje para evitarlo e incluso puede llegar a modificar rasgos de conducta específicos de la especie, incluyendo la conducta social (Zimmermann, 1986).

Signos de dolor en animales de experimentación

Reconocer el dolor en animales es un gran desafío ya que no solo no pueden comunicarnos verbalmente que sienten dolor, sino que los animales tienden a esconderlo para no ser presas fáciles de predadores,

ya que es una cuestión de sobrevivencia (Carstens 2000; Rivera 2009).

La semejanza en la estructura y función de los sistemas nerviosos entre humanos y otros mamíferos, junto con la similitud en las respuestas conductuales a los estímulos dolorosos, proporciona evidencia de que los animales sienten dolor, lo que resulta en sufrimiento (Broom, 2001). Este razonamiento no es aceptado por toda la comunidad científica, hay quienes argumentan que se requiere ser consciente del dolor para que ocurra el sufrimiento y que esto se limita a los humanos y a una pequeña variedad de otras especies (Bermond 2001; Flecknell 2018).

Para comprender adecuadamente la naturaleza aversiva del dolor y el alcance del sufrimiento, tanto los elementos sensoriales como afectivos del dolor deben evaluarse de una manera validada y confiable y adoptando un enfoque funcional más que anatómico del dolor (McLennan, 2019). Es aconsejable asumir que “a menos que se establezca lo contrario, los investigadores deben considerar que los procedimientos que causan dolor o angustia en los seres humanos pueden causar dolor o angustia en otros animales» (IRAC, 1985).

Quienes trabajamos con animales de experimentación debemos aprender a reconocer alteraciones en el comportamiento y en el aspecto físico de los

animales para saber si están soportando dolor y tomar las medidas para aliviarlo. Un ejemplo de ello es conocer el código facial de expresiones de dolor en animales de laboratorio que se han descrito para diversas especies: ratones (Fig. 43) (Langford, 2010), ratas (Sotocinal, 2011) y conejos (Hampshire, 2015). El uso de la escala de los códigos faciales es una técnica complementaria prometedora en algunas especies de mamíferos para identificar y evaluar el dolor en animales de investigación (Cohen, 2020).

Algunos ejemplos de comportamientos relacionados al dolor se presentan en la Tabla 8, anexo III.

La investigación sobre la evaluación del dolor en animales ha tendido a utilizar alguno de estos tres enfoques (Weary, 2006):

- Medidas del funcionamiento general del cuerpo, como la ingesta de alimentos y agua o el aumento de peso; micción y defecación; dilatación de pupilas; taquicardia
- Medidas de respuestas fisiológicas. Estas incluyen medidas de las respuestas del sistema simpático-adrenomedular, como cambios en la frecuencia cardíaca debido a la liberación de noradrenalina, y respuestas del sistema hipotalámico-pituitario-adrenocortical, como concentraciones de cortisol, hormona adrenocorticotrópica y factor liberador de corticotropina.

- Medidas del comportamiento como las vocalizaciones (no siempre audibles), lucha o agresiones defensivas o redirigidas

Anestesia

La anestesia es un estado reversible producido por fármacos, caracterizado por la ausencia de cualquier tipo de percepción sensorial, ya sea dolorosa o no. La administración de estos fármacos bien sea uno solo o la combinación de varios, normalmente produce un estado de depresión de la corteza cerebral que impide la llegada o reconocimiento de cualquier estímulo sensorial (Alvarez Gomez 2008; Remie 2016). Anestesiarse a un animal no es solamente administrar la droga anestésica de forma adecuada, sino que es un proceso que involucra una serie de cuidados previos, durante y posteriores al procedimiento, todos de importancia, sin los cuales las respuestas del animal a la anestesia pueden generar problemas de estrés, además de prolongar la recuperación, alterar el bienestar del animal y los datos científicos que se obtengan (Rivera, 2019).

Puede ser necesaria una anestesia leve para poder manipular el animal en un procedimiento o una anestesia más profunda para un procedimiento doloroso; los diferentes niveles de anestesia se pueden producir de varias formas, usando un solo agente o combinaciones de agentes y técnicas. Los anestésicos locales o regionales bloquean toda sensación, incluido el dolor, en un área específica; los anestésicos generales producen pérdida del conocimiento



Fig. 43: Escala de código facial en ratones (adaptado de Langford, 2010).

y diversos grados de supresión de la percepción del dolor, dependiendo de la dosis administrada. Puede ocurrir que diferentes agentes anestésicos generales proporcionan niveles similares de hipnosis (sueño), pero el grado de analgesia proporcionado puede variar ampliamente (Flecknell, 2015).

En general, la anestesia puede afectar algunos parámetros fisiológicos, como la presión, la saturación de oxígeno en sangre, el flujo sanguíneo cerebral y muchos otros factores que pueden afectar el seguimiento postoperatorio. La mayoría de los agentes anestésicos disminuyen el metabolismo cerebral y, a menudo, afectan la neurotransmisión de los impulsos nerviosos, por lo que se debe controlar la temperatura corporal y otros parámetros fisiológicos durante la anestesia (Cicero, 2018).

La razón principal para utilizar anestésicos es el proveer contención humanitaria, un grado razonable de relajación muscular para facilitar el procedimiento y lo más importante analgesia suficiente para que el animal no sienta dolor (Wolfensohn 2013; Remie 2016).

Cuando se determina que un procedimiento necesita el uso de anestesia, esta debe ejercer un impacto mínimo sobre el animal y sobre la investigación. Puede ser una anestesia general (animal inconsciente) o local/regional (solo una región no percibe estímulo sensorial).

Existen diferentes técnicas anestésicas como veremos en este capítulo, la elección de ella dependerá

de diferentes factores (Alvarez Gomez 2008; Remie 2016):

1. Especie: nunca debemos extrapolar la dosis de una especie a otra. Normalmente cuanto más pequeña es la especie, mayor es la dosis en mg/kg de peso corporal que hay que utilizar; por ejemplo, la ketamina en vaca o caballo se usa en una dosis de 1 mg/kg, mientras que en ratón es de 200 mg/kg. La causa radica en que cuanto más pequeño es el animal, mayor es su tasa metabólica. Una hora de procedimiento en un ratón tiene el mismo costo metabólico que el mismo procedimiento durante 6 horas en un gato. El metabolismo y excreción de fármacos parenterales en mamíferos pequeños como ratón o rata son rápidos generando una disminución en la duración de acción del fármaco.
2. Estado del animal y objetivo de la investigación: en animales que presentan alguna patología hay que estudiar la posible influencia de los fármacos que se van a administrar. Algunos anestésicos poseen efectos secundarios y se deben evitar en los casos de patologías sensibles a los mismos, o cuando puedan interferir en el objetivo de la investigación, por ejemplo, no se pueden administrar fármacos con efecto hipotensor, cuando se pretende estudiar función cardiovascular.
3. Tipo de procedimiento: procedimientos quirúrgicos prolongados y muy dolorosos, requieren plano anestésico más profundo, esto se consigue

aumentando la dosis de anestésico (lo que conlleva a un aumento de los efectos secundarios, como la depresión cardiovascular y respiratoria), o mediante la asociación de analgésicos potentes de tipo opiáceos.

4. Duración del procedimiento: anestesia prolongada se puede mantener con dosis repetidas de fármacos inyectables de acción corta o media (o su infusión continua) o con fármacos de acción prolongada. La anestesia inhalatoria puede emplearse en procedimientos de cualquier tipo de duración.
5. Experiencia del investigador y equipamiento disponible. Una vez definida la técnica a utilizar debe estar disponible y en buenas condiciones todo el equipamiento necesario.

Por tanto, la elección de la técnica anestésica dependerá de la especie con que se trabaja, el estado del animal y los objetivos de la investigación, el tipo y duración de procedimiento que se realizará y la experiencia del investigador y del equipo disponible

Terminología relacionada con el tema (Remie, 2016)

- *Analgesia*: estado reversible producido por fármacos, caracterizado por la ausencia de cualquier tipo de percepción sensitiva ya sea

dolorosa o no. Puede causar amnesia como forma de prevenir la formación de recuerdos.

- *Anestesia general*: pérdida temporal controlable de la conciencia, inducida por la intoxicación del sistema nervioso central
- *Sedación*: estado de calma generalmente acompañado de somnolencia, reduce el miedo y la aprensión en los animales
- *Tranquilización*: calma sin sedación, las dosis altas pueden provocar ataxia (movimiento inestable y descoordinado). Si bien varios anestésicos tienen diferentes mecanismos de acción, existe una superposición considerable en la acción de muchos agentes. Además, las diferentes especies animales a menudo responden de manera diferente a varios anestésicos.
- *Tiempo para el efecto pico*: tiempo entre la aplicación inicial y la obtención del efecto máximo esperado.
- *Duración del efecto*: medida del tiempo del efecto pico que puede esperarse después de una sola aplicación de una dosis analgésica.
- *Tiempo de recuperación*: tiempo entre la aplicación inicial y la habilidad para pararse sin ayuda.

Objetivos de la analgesia y anestesia

1. Facilitar la manipulación del animal o la realización de procedimientos quirúrgicos dolorosos.
2. Proporcionar un trato humanitario a los animales, reduciendo al mínimo el sufrimiento asociado a dicha manipulación, y evitando situaciones dolorosas, de angustia o ansiedad.
3. Reducir al mínimo las consecuencias negativas de la cirugía sobre la fisiología del animal.
4. Permitir la realización de investigaciones que no podrían llevarse a cabo con el animal consciente.

Recomendaciones generales

1. El animal se debe manipular de forma delicada y con calma para evitar excitación y miedo.
2. No debe extrapolarse una técnica anestésica de una especie a otra.
3. Debe adecuarse la profundidad anestésica a las necesidades del procedimiento.
4. La anestesia inhalatoria es en la mayoría de los casos la más útil.

5. La analgesia debe considerarse siempre intra y postoperatoria. Se debe justificar siempre la ausencia de anestesia y analgesia durante procedimientos dolorosos.
6. El uso de relajantes musculares debe estar sólidamente justificado o no emplearse.

Componentes de una anestesia general (Remie, 2016)

1. Hipnosis o sueño: el animal está ausente del medio circundante.
2. Analgesia: ausencia de percepción dolorosa.
3. Relajación muscular: desde moderada a parálisis (bloqueantes neuromusculares). En animales de laboratorio la relajación muscular que producen casi todos los anestésicos es suficiente para la mayoría de los procedimientos quirúrgicos.
4. Bloqueo de actividad refleja, impiden respuestas del sistema nervioso autónomo incluyendo alteraciones de frecuencia y ritmo cardiaco entre otras.

Un anestésico ideal incluye los cuatro componentes antes indicados de forma estable, sin afectar a otras funciones orgánicas, y además debe ser de fácil administración, reversible, de bajo costo y seguro,

tanto para el animal como para el operador (Alvarez Gomez, 2008).

Fases de la anestesia y fármacos

La anestesia consta de varias fases, preanestesia (no todas las especies la requieren), anestesia propiamente dicha y postoperatorio. A continuación, veremos cada una de estas fases y los grupos farmacológicos utilizados en cada una de estas fases.

Ayuno preanestesia

El ayuno preanestésico de conejos y roedores pequeños es innecesario, ya que en estas especies no se producen vómitos durante la inducción (Álvarez Gómez, 2008). Ocasionalmente se pueden observar problemas con los cobayos, ya que pueden retener alimentos en la faringe después de haber sido anestesiados. Si esto ocurre en un número significativo de animales, debe introducirse un breve período de ayuno preanestésico (3-4 horas). Una excepción ocurrirá si se va a realizar una cirugía del tracto gastrointestinal y se requiere una reducción en el volumen del contenido intestinal. En estas circunstancias, el ayuno puede ser necesario en todas las especies, pero es importante tener en cuenta que los roedores y los conejos son coprofágicos, por lo que pueden ser necesarias medidas para evitar que ingieran sus heces

para proporcionar un estómago completamente vacío (Flecknell, 2015).

Preanestesia

Durante este período se administran fármacos para tranquilizar o sedar el animal. No siempre es necesario, en el caso de la rata y el ratón no la requieren. Tiene como ventajas que reduce o elimina la ansiedad y el miedo en el animal; permite un buen manejo de este; reduce la dosis del anestésico en un 30 a 50 %. El uso de analgésicos puede reducir el dolor, especialmente en el período postoperatorio inmediato, y puede proporcionar un alivio del dolor más eficaz mediante la *analgesia preventiva*. Administrar sedantes, tranquilizantes y analgésicos puede reducir la cantidad de anestésico necesaria para producir el nivel deseado de anestesia. Estos agentes también proporcionan una inducción más suave de la anestesia y una recuperación más agradable (Flecknell, 2015).

La selección de un régimen de fármaco preanestésico dependerá de la especie animal a anestesiarse; los agentes anestésicos que se utilizarán; los requisitos particulares del protocolo de investigación; y las preferencias personales del anestesista (Flecknell, 2015).

Como preanestésicos se pueden utilizar:

1. *Atropina*: anticolinérgico, reduce las secreciones bronquiales y salivales que podrían ocluir parcialmente las vías respiratorias. La atropina protege al corazón de la inhibición vagal que

puede ocurrir durante la intubación endotraqueal o durante los procedimientos quirúrgicos, en especial si se manipulan las vísceras. La atropina también se puede usar para corregir la bradicardia causada por opioides (Flecknell, 2015). Se debe evitar su uso si la frecuencia cardíaca es elevada (Álvarez Gómez, 2008).

2. *Glicopirrolato*: tiene las mismas propiedades que la atropina, se utiliza en conejos ya que los conejos poseen atropinesterasa en su sangre lo que implicaría el uso de dosis mayores de atropina.
3. *Fenotiacinas (chlorpromacina, acepromacina, promacina)*: estos agentes producen sedación, potencian la acción de anestésicos hipnóticos, de analgésicos opiáceos, lo que permite reducir la dosis de fármaco necesaria para obtener el plano anestésico quirúrgico. La sedación puede extenderse hasta el período postoperatorio, de modo que la recuperación de la anestesia sea suave. Este grupo de fármacos no tiene acción analgésica, pero potencian la acción de los opiáceos. Como efectos secundarios al ser bloqueantes adrenérgicos α_1 pueden producir hipotensión moderada debido a la dilatación de los vasos sanguíneos periféricos, la regulación de la temperatura está deprimida y pueden producirse descensos moderados de la temperatura corporal (Álvarez Gomez 2008; Flecknell 2015).
4. *Benzodiazepinas (diazepam y midazolam)*: el efecto sedante en animales de laboratorio es

escaso. Se utilizan principalmente como fármaco coadyuvante de la ketamina para inducir anestesia en roedores y conejos (Álvarez Gómez, 2008). Producen una buena relajación de la musculatura esquelética sin producir parálisis. Los efectos hipnóticos (inductores del sueño) de estos agentes en los animales, a diferencia de los humanos, son generalmente mínimos. Tiene como antagonista el flumacénilo lo que permite revertir su acción si es necesario (Flecknell, 2015).

En el siguiente cuadro se muestran los anestésicos comúnmente recomendados (dosis/kg) en animales de experimentación según su profundidad (adaptado de Parasuraman, 2010).

En anexo III, las tablas 9 a 12 se detallan fármacos utilizados en anestesia y analgesia por especie. A continuación, se listan los anestésicos más utilizados y las diferentes vías según la especie en cuestión:

Anestesia

Dependiendo del tipo de cirugía o procedimiento, la combinación particular de anestésicos puede diferir; por lo cual siempre dependerá del procedimiento que se realice y la especie, el tipo de anestesia que utilicemos.

En la anestesia existen tres períodos, a saber:

1. período de inducción; puede ser inyectable o inhalatoria;
2. período de mantenimiento; se puede obtener por medio de una dosis única o repetidas inyectable, o inhalatoria;
3. período de recuperación en el que generalmente, de ser posible, se utilizan antagonistas del anestésico. Esta debe ser gradual y libre de excitación.

Especie	Anestesia <i>corta</i>	Anestesia <i>media</i>	Anestesia <i>larga</i>
Ratón	Isoflurano (inhalación)	Xilacina + Ketamina (5 mg + 100 mg IP)	Xilacina + Ketamina (16 mg + 60 mg IP)
	Halotano (inhalación)		
Rata		Xilacina + Ketamina (5 mg + 100 mg IP)	Xilacina + Ketamina (16 mg + 60 mg IP)
			Uretano (1200 mg/kg IP)
Cobayo	Isoflurano (inhalación)	Xilacina + Ketamina (52 mg + 80 mg IM)	Xilacina + Ketamina (4 mg + 100 mg IM)
Conejo	Isoflurano (inhalación)	Xilacina + Ketamina (5 mg + 15 a 30 mg IM)	Xilacina + Ketamina (5 mg + 100 mg IM)

l) Anestésicos inyectables o parenterales

Los anestésicos inyectables tienen como ventaja ser de bajo costo y el equipo necesario a utilizar es mínimo. Se pueden administrar por diferentes vías, pero generalmente la intravenosa (IV) es la de elección ya que el inicio del efecto es más predecible y rápido. En muchas especies de laboratorio más pequeñas (por ej., roedores), las consideraciones prácticas, como la ausencia de venas superficiales adecuadas o la dificultad para sujetar adecuadamente al animal, pueden limitar el uso de la vía IV. La administración por inyección intraperitoneal (IP), subcutánea (SC) o intramuscular (IM) es relativamente sencilla en la mayoría de las especies, pero la velocidad de absorción del fármaco y, por tanto, sus efectos anestésicos, pueden variar considerablemente. Entre los factores que deben tenerse en cuenta al seleccionar la vía de administración del anestésico (IM, IP, o SC) se debe considerar el amplio margen de seguridad y posibles irritaciones causadas por el fármaco que podrían resultar en dolor o molestias innecesarias para el animal; en particular en la vía IM en pequeños roedores (Remie, 2016).

- *Fenilciclina (ketamina y tiletamina)*: se emplean para inducir inmovilización y anestesia general. Inducen sus efectos mediante interrupción de las vías nerviosas encefálicas y estimulación del sistema de retículo activado, lo que causa estimulación selectiva del SNC por supresión farmacológica de las neuronas inhibitorias e induce una anestesia disociativa o catalepsia, en la que hay aumento del tono muscular, movimientos musculares esqueléticos reflejos y mantenimiento de los reflejos

protectores (Regueiro-Purriños, 2013). Estos anestésicos producen un estado hipnótico diferente a los otros grupos de anestésicos. Es una anestesia disociativa, el animal parece estar consciente, pero indiferente al entorno. El efecto analgésico es muy variable según la especie. Mantiene reflejos como la deglución, y aumenta las secreciones respiratorias, lo que se puede controlar mediante el uso de atropina o glicopirrolato. Se pueden utilizar en cualquier animal de laboratorio, menos en perros, ya que producen excitación. Los efectos cardiovasculares son menores si se los compara con otros anestésicos, pero la depresión respiratoria suele ser elevada en roedores. La combinación de fármacos tranquilizantes no solo disminuye los efectos adversos de la ketamina o de la tiletamina, sino que permite reducir la dosis empleada y proporcionar una analgesia adecuada (Álvarez Gómez 2008; Flecknell 2015; Remie 2016). Es extremadamente útil cuando se administra en combinación con medetomidina, xilazina o diazepam para la producción de anestesia quirúrgica en ovejas, primates, gatos, perros, cerdos, conejos y pequeños roedores. Es importante tener en cuenta que los efectos estimulantes de la ketamina en el sistema cardiovascular no compensan los efectos depresores de fármacos como la xilazina, y el uso de estas combinaciones casi invariablemente provoca una hipotensión significativa (CCPA Manual 1998; Flecknell 2015; Remie 2016). La administración crónica de Ketamina da como resultado la inducción de enzimas hepáticas, y esto puede disminuir la eficacia del fármaco en administraciones posteriores (Flecknell, 2015). La Tiletamina

posee un efecto más durable y potente, por lo que las dosis a administrar son menores, se debe tener en cuenta que es nefrotóxica en conejos (CCPA Manual, 1998).

- *Barbitúricos (tiopental sódico y pentobarbital)*: los barbitúricos se agrupan según su duración de acción: larga, corta o media y ultracorta (CCPA Manual, 1998). Aunque los barbitúricos están ampliamente utilizados, generalmente no son una buena elección para la anestesia general, debido a su efecto analgésico débil, a sus efectos cardiovasculares profundos, a su alta mortalidad y a numerosos factores externos que pueden afectar la dosis/respuesta y el tiempo de sueño (CCPA Manual 1998; Álvarez Gómez 2008; Remie 2016). El pentobarbital puede ser utilizado por vía intravenosa o intraperitoneal, es de los clasificados dentro del grupo corta o media duración. Causa severa depresión cardiovascular y respiratoria y tiene una pobre actividad analgésica. La recuperación suele ser lenta en particular si se administra una segunda dosis para extender la anestesia. A pesar de estas características es muy utilizado como anestésico en animales de laboratorio (CCPA Manual 1998; Flecknell 2015). El tiopental sódico, de corta duración, se usa para la inducción anestésica, utilizando otros anestésicos para el mantenimiento, ya que provoca un efecto acumulativo que incrementa excesivamente el período de recuperación (CCPA Manual 1998; Álvarez Gómez 2008). Su principal efecto es una depresión del SNC por inhibición de distintos neurotransmisores sinápticos mediante su interacción con

receptor del GABA (Regueiro-Purriños, 2013). Por ser el tiopental altamente irritante (provoca necrosis por extravasación), principalmente por su alto pH, no debe administrarse por vía IP, IM o SC. El principal uso del fármaco es mediante inyección intravenosa para proporcionar una inducción rápida de la anestesia, seguida de mantenimiento mediante agentes inhalatorios (Álvarez Gómez 2008; Flecknell 2015).

- *Propofol*: es un derivado alquilfenólico que induce una disminución de la actividad cerebral mediante la activación del neurotransmisor inhibidor GABA, principal neurotransmisor inhibidor del SNC que hace que la unión de dicho neurotransmisor a sus receptores se produzca de manera más potente (Regueiro-Purriños, 2013). Anestésico hipnótico de acción ultracorta, su acción es muy similar a la del tiopental sódico. Poca actividad analgésica por lo que suele asociarse a opiáceos cuando se requiere acción analgésica. Se administra en exclusividad por vía IV. A diferencia del tiopental sódico la administración repetida del fármaco no produce un efecto acumulativo, ni tampoco provoca necrosis por extravasación. Constituye una alternativa a los anestésicos halogenados porque puede administrarse en infusión continua manteniendo una elevada estabilidad durante la anestesia (Álvarez Gómez, 2008). El propofol produce una rápida inducción de un corto período de anestesia en una amplia gama de especies. La recuperación es suave y rápida con poco efecto acumulativo si se administran dosis adicionales (Flecknell 2015; Remie 2016).

- *Etomidato y metomidato*: ambos de acción ultracorta (Flecknell, 2015). El etomidato es un derivado imidazólico que debe su efecto hipnótico a su acción sobre receptores del GABA, su comienzo de acción es rápido tras la administración IV, así como la recuperación. Como agente único, los efectos cardiovasculares son mínimos, tanto en animales sanos como en hipovolémicos (Regueiro-Purriños, 2013). Tienen un metabolismo rápido y la administración continua resulta en un leve efecto acumulativo en el tiempo de recuperación (Flecknell, 2015). Presentan poca acción analgésica y se ha reportado que suprimen la función adrenocortical luego de una infusión prolongada de etomidato. Ambos son útiles para proporcionar inconsciencia (y por lo tanto inmovilización) en muchos mamíferos, aves, reptiles y peces. El metomidato en combinación con fentanilo, administrados como inyección SC, es una combinación anestésica eficaz para roedores pequeños (Flecknell, 2015).

II) Anestésicos inhalatorios

Los anestésicos que se administran por inhalación suelen ser líquidos volátiles que se vaporizan antes de la administración y se aplican al animal mediante un gas o una mezcla de gases (Remie, 2016). Todos los sistemas utilizados para anestesia inhalatoria tienen como objetivo administrar suficiente gas anestésico para cumplir con los requisitos del animal y eliminar

los gases exhalados, que contienen dióxido de carbono. Lo ideal es eliminar esos gases exhalados fuera del área donde se están utilizando, ya que las concentraciones de trazas de estos gases anestésicos pueden tener efectos adversos en el personal que los administra. Algunos de estos anestésicos son explosivos, inflamables, o irritantes para los tejidos. La exposición crónica a algunos de estos anestésicos es peligrosa para la salud del personal de las salas de cirugía (CCPA Manual 1998; Flecknell 2015). Generalmente es el método utilizado para inducción y mantenimiento cuando se utilizan pequeños animales (Cicero, 2013)

Los anestésicos por inhalación tienen la ventaja de requerir una desintoxicación mínima por el organismo, ya que son expirados por los pulmones, y además el nivel de anestesia puede ser fácil y rápidamente controlado (CCPA Manual, 1998). Sin embargo, requieren un equipo costoso compuesto por una fuente de gas (oxígeno), un manorreductor, un regulador de flujo y un vaporizador donde se coloca el fármaco líquido (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 2011; Flecknell 2015), En las Figs. 44 a 47 se muestran los distintos tipos de circuitos anestésicos utilizados.

En pequeños roedores es común el uso de cámaras de inducción o cámaras inhalatorias, construidas de material plástico donde se coloca el animal consciente, esta cámara tiene un orificio de entrada de gas fresco (con anestésico) y otro de salida (Álvarez Gómez 2008; Flecknell 2015) (Fig. 48).

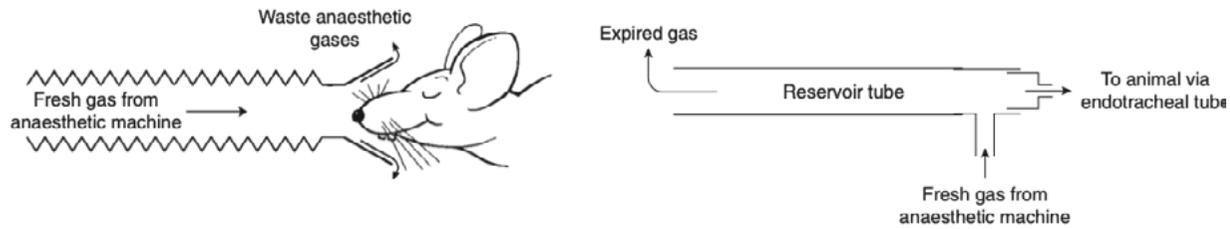


Fig. 44: Circuito con mascara abierta y Circuito Ayre en T semiabierto, se muestra el flujo del gas (adaptado de Flecknell, 2015)

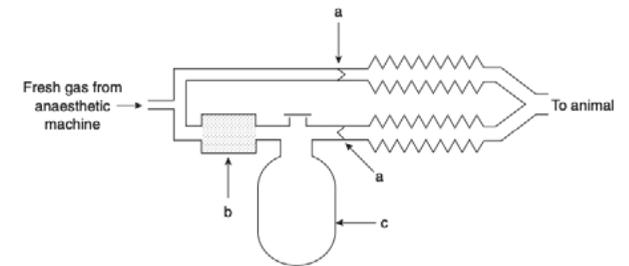


Fig. 47: Circuito cerrado (adaptado de Flecknell, 2015)

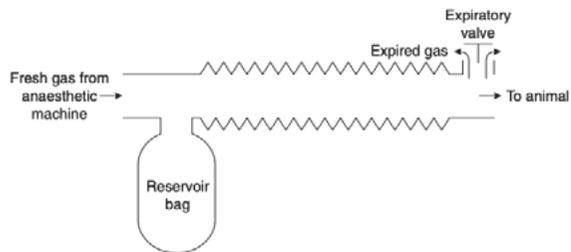


Fig. 45: Circuito Magill (adaptado de Flecknell, 2015)

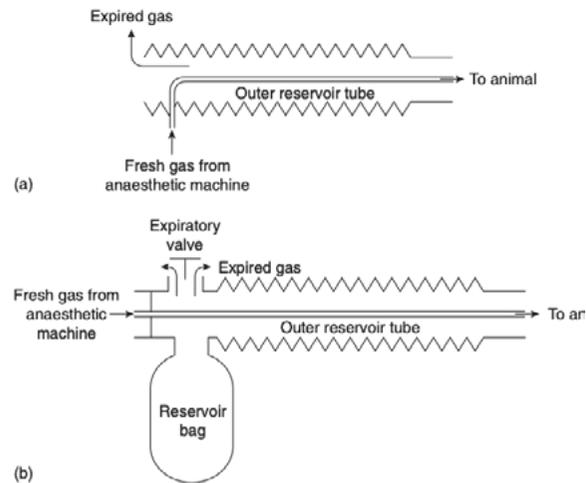


Fig. 46: (a) Circuito Bain y (b) Bain modificado (adaptado de Flecknell, 2015)

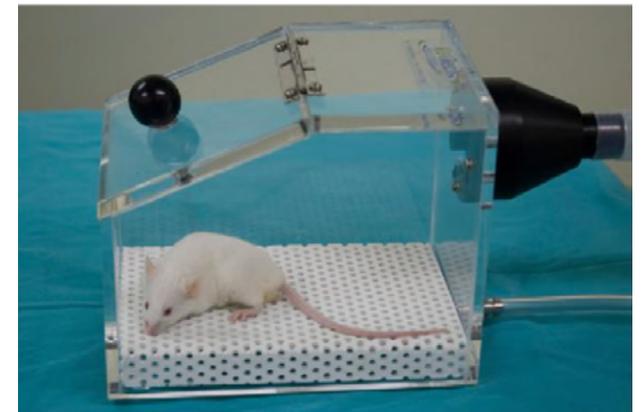


Fig. 48: Cámara de inducción inhalatoria (adaptado de Flecknell, 2015)

Las velocidades de inducción y de recuperación de la anestesia dependen de la solubilidad del anestésico en la sangre. Anestésicos altamente solubles (metoxiflurano) alcanzan lentamente el equilibrio en la sangre; por lo tanto, la inducción de la anestesia y la recuperación se prolongan. Los anestésicos insolubles (halotano) alcanzan con rapidez el equilibrio, facilitando el control de la profundidad de la anestesia, pero también incrementando los riesgos de una rápida sobredosis (CCPA Manual 1998; Flecknell 2015). Todos los anestésicos volátiles inducen alteraciones en el sistema cardiovascular de manera dependiente de la dosis; los mecanismos son diversos dependiendo del agente (Regueiro-Puriños, 2013).

Los anestésicos inhalatorios más utilizados son el halotano e isoflurano. Anestésicos halogenados, no irritantes, no explosivos y no inflamables, son los más versátiles y proporcionan gran seguridad al utilizarlos. El halotano es económico y produce una anestesia rápida en la mayoría de los animales, es buen analgésico y produce una adecuada relajación muscular. Aunque se ha dejado de utilizar por sus efectos secundarios, al tener metabolización hepática puede producir metabolitos potencialmente nefrotóxicos; por ello en animales de laboratorio el halotano se ha reemplazado por isoflurano (Flecknell 2015; Remie 2016). El isoflurano es más rápido aún y la recuperación de su anestesia y su profundidad se puede variar rápida y fácilmente, pero es más costoso. El isoflurano produce moderada depresión cardiovascular y respiratoria, produce una mejor relajación muscular que el halotano, pero es menos analgésico se elimina casi completamente por el

pulmón por lo que no afecta el metabolismo hepático renal (CCPA Manual 1998; Álvarez Gómez 2008; Flecknell 2015).

Consideraciones generales según la especie

Conejos: es una especie de alto riesgo anestésico, se deben tener en cuenta algunas particularidades anatómicas y fisiológicas de la especie al momento de elegir el protocolo anestésico a seguir. En ellos son frecuentes las enfermedades subclínicas respiratorias y renales que pueden causar complicaciones al momento de la anestesia. Su cavidad torácica es pequeña y se puede comprimir fácilmente por dilatación de las vísceras abdominales o por un posicionamiento inadecuado durante el período anestésico; por lo que pueden sufrir complicaciones anestésicas tales como: insuficiencia respiratoria e incluso apnea. Se estresan con facilidad al ser manipulados produciendo gran liberación de catecolaminas, que pueden producir arritmias y paros cardiacos (Flecknell 2015; Cicero 2018). En la tabla 11 del anexo III se detallan los anestésicos más utilizados en conejos.

Roedores: No es necesario el ayuno previo a la anestesia ya que no poseen el reflejo del vómito. Al igual que los conejos pueden tener enfermedades subclínicas respiratorias pudiendo generar problemas al momento de la anestesia. Las principales complicaciones anestésicas en roedores son: hipotermia, hipoglucemia, depresión respiratoria y cardiovascular,

complicaciones que se agravan, en ocasiones, por una deficiente monitorización anestésica (Cicero, 2018). En las tablas 9 y 10 del anexo III se detallan los anestésicos más utilizados en roedores.

Cuidados posanestésicos

Debe existir disponible un área de recuperación separada para animales que han pasado por una cirugía. Esta área de recuperación, que permitiría la atención adecuada a cada animal, debe incluir condiciones ambientales apropiadas, como el aumento de la temperatura ambiental. Durante la recuperación de la anestesia, se debe tener cuidado de mantener las vías respiratorias sin obstrucciones y mantener a los animales calientes. En la mayoría de los casos, se puede permitir que los animales pequeños se recuperen en sus jaulas normales o dentro de una incubadora. Los animales adultos requieren una temperatura ambiental de 25 a 30 °C, y los neonatos requieren una temperatura de 35 a 37 °C y en ambiente tranquilo. Si no se dispone de una incubadora, se deben proporcionar almohadillas térmicas o lámparas. Aunque se necesita calor, también se debe tener cuidado de no sobrecalentar al animal. Después de los procedimientos quirúrgicos invasivos, los animales pueden experimentar dolor postoperatorio que se debe controlar con analgésicos (Remie, 2016).

Analgesia

El manejo del dolor en la experimentación animal es un imperativo ético (Carbone, 2016). Una buena analgesia se puede obtener a través del uso de fármacos, de una manipulación adecuada y del refinamiento de los procedimientos (Álvarez Gómez, 2008) El protocolo de analgesia óptimo debe aliviar el dolor de manera confiable y carecer de efectos secundarios que puedan afectar el bienestar animal. Además, debe tener un efecto controlable en el sistema específico objetivo del experimento o en los procedimientos experimentales. A la luz de los muchos aspectos que deben considerarse (especie, tipo de dolor, pregunta de investigación, etc.), no existe una analgesia única para todos (Jirkof, 2017).

Como ya se mencionó al inicio de este capítulo debemos conocer la conducta habitual del animal, su aspecto y las características anatómicas y fisiológicas de la especie que se esté utilizando.

Analgesia Preventiva: Si se administran analgésicos antes de cualquier estímulo potencialmente doloroso, estos son en general más efectivos para prevenir el dolor posoperatorio. Por esta razón, se recomienda ampliamente que los analgésicos se administren antes del procedimiento para proporcionar un alivio del dolor más efectivo y posiblemente reducir la dosis de anestésico requerida (Álvarez Gómez 2008; Flecknell 2015 y 2018; Remie 2016).

Agentes analgésicos

Antiinflamatorios no esteroidales (AINE)

Se consideraban analgésicos de baja potencia, ideales para el control del dolor moderado, o agentes que también son utilizados en algunas condiciones especiales como la artritis, donde el componente inflamatorio de la enfermedad es el principal responsable del dolor. En la actualidad existen nuevos compuestos que han cambiado esto, por lo que pasaron a ser analgésicos de importancia. Su acción se debe principalmente a la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX). Los efectos secundarios más importantes asociados a el uso de AINE durante una prolongada administración son: trastornos gastrointestinales, en especial úlceras y hemorragias, nefrotoxicidad y la interferencia con la función plaquetaria (Flecknell 2015 y 2018; Jirkof 2017).

Los AINE más usados son:

1. **Ácido acetil salicílico (Aspirina):** alivia el dolor moderado. Como efecto secundario presenta daño en la mucosa gastrointestinal, inhibición de la agregación plaquetaria.
2. **Acetaminofeno (Paracetamol):** tiene similar eficacia que la aspirina, pero además cuenta con una pequeña actividad antiinflamatoria. Como efecto secundario presenta irritación gastrointestinal y en sobredosis produce hepatotoxicidad. En dolores agudos en ratas y ratones tiene un

claro efecto analgésico, por lo que se utiliza para el alivio del dolor postoperatorio.

3. **Ibuprofeno:** en animales no se han realizado ensayos clínicos controlados para determinar su eficacia
4. **Fenilbutazona:** muy utilizado para el control del dolor moderado en grandes especies.
5. **Ketoprofeno:** proporciona un alivio moderado del dolor en ratas. Su eficacia en otras especies es incierta, aunque se pueden sugerir tasas de dosis efectivas probables.

b) Opioides (analgésicos narcóticos)

Existe una gran variedad de estos analgésicos que varían en su potencia, duración de acción y efectos secundarios. Se utilizan rutinariamente en animales de laboratorio, el efecto analgésico de los opioides es inducido por dos mecanismos: efectos inhibitorios sobre la transmisión del dolor y el desapego emocional al dolor (Jirkof 2017; Flecknell 2018). Se clasifican según la actividad en sus receptores específicos, los más importantes son mu (μ) y kappa (κ):

1. **Morfina y Fentanilo:** son de los llamados agonistas puros ya que actúan en todos los receptores por lo que tienen una analgesia más potente. Se usan si el procedimiento es muy doloroso o para reducir las dosis de agentes inhalatorios y sus efectos depresores cardiovasculares (anestesia

equilibrada). También son empleados asociados a tranquilizantes-sedantes produciendo la denominada neuroleptoanalgesia, ya que son malos hipnóticos y requieren ser combinados con otros fármacos para producir una hipnosis adecuada. La ventaja de estas combinaciones anestésicas a base de opiáceos es que su efecto puede revertirse utilizando antagonistas (Álvarez Gómez 2008; Flecknell 2015).

2. *Buprenorfina, Butorfanol*: analgésicos opioides de acción moderada, actúan sobre alguno de los receptores opiáceos o lo hacen débilmente (Álvarez Gómez 2008; Flecknell 2015). Son adecuados para el postoperatorio, pero también se emplean en la premedicación anestésica. La buprenorfina es uno de los analgésicos postoperatorios más empleados en roedores y en los animales de laboratorio en general (Álvarez Gómez 2008; Flecknell 2015 y 2018). Al administrar opioides (en particular buprenorfina) se ha observado como efecto adverso particularmente el comportamiento llamado *pica* que es la ingesta de materiales no nutritivos como la cama. Se cree que este comportamiento indica náuseas en animales que no poseen el reflejo del vómito (Flecknell, 2018)
3. *Tramadol*: agonista opioide que tiene acción analgésica mediada por la inhibición de la recaptación de serotonina y noradrenalina en la médula espinal. Se ha recomendado su uso en animales como una alternativa a los opioides más potentes, aunque se metaboliza

rápidamente en varias especies. El metabolito principal tiene una actividad opioide moderada, pero no tiene efectos sobre la serotonina y la noradrenalina (Flecknell, 2015 y 2018)

c) Anestésicos locales

La anestesia implica la ausencia de cualquier tipo de sensación, dolorosa o no, pero cuando afecta solo a una parte del organismo se la denomina anestesia local o regional. Esta técnica es muy eficaz porque actúa allí donde se produce el estímulo doloroso, reduciendo considerablemente los efectos secundarios derivados de su acción sistémica (Álvarez Gómez, 2008). Son poco usados en pequeños roedores. Presumiblemente, esto se debe a problemas prácticos, ya que la seguridad y la eficacia de los anestésicos locales de uso común son similares a las de otras especies. Hay menos datos en cobayos, pero la experiencia clínica y los estudios de laboratorio indican que todos los agentes pueden usarse con éxito en esta especie (Flecknell, 2015 y 2018). Los anestésicos locales se pueden administrar como spray, por infiltración local, por bloqueo de nervios sensoriales específicos y por vía epidural o intratecal. A los pequeños mamíferos solo se les pueden administrar pequeños volúmenes de formulaciones comerciales de anestésicos locales, pero tanto la Lidocaína como la bupivacaína se pueden diluir 1:4 con efectos moderados en la duración de la acción (Flecknell, 2018).

Terapia del dolor multimodal

El dolor posoperatorio surge de la activación de una multiplicidad de vías, mecanismos y sistemas transmisores. La administración de una sola clase de analgésico a menudo no logra suprimir todos estos mecanismos, incluso cuando se usan dosis altas, por lo que se deben tener en cuenta todos los posibles efectos secundarios de cada uno de los fármacos a utilizar. La terapia multimodal implica el uso de diferentes analgésicos de forma de proporcionar una analgesia más eficaz (Álvarez Gómez 2008; Flecknell 2015; Jirkof 2017; Flecknell 2018)

Bibliografía

- Álvarez Gómez I (2008): Métodos de anestesia, analgesia y eutanasia. En: Ciencia y tecnología del animal de laboratorio, Cap 14.
- Bermond, B. (2001): A neuropsychological and evolutionary approach to animal consciousness and animal suffering. *Anim. Welf.* 10, 547-62.
- Broom, D.M. (2001): The evolution of pain. *Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.* 70, 17-21.
- Cartens E, Gary P (2000): Recognizing pain and distress in laboratory animals. *ILAR Journal*, Volume 41(2): 62-71
- Carbone L, Austin J (2016): Pain and Laboratory Animals: Publication Practices for Better Data Reproducibility and Better Animal Welfare. *PLoS ONE* 11(5): e0155001. Doi:10.1371/journal.pone.0155001
- Cicero L, Fazzotta S, Davide V, Cassata G, Lo Monte A (2018): Anesthesia protocols in laboratory animals used for scientific purposes. *Acta Biomed* 2018; Vol. 89, N. 3: 337-342
- Cohen S, Beths T (2020): Grimace scores: tool to support the identification of pain in mammals used in research. *Review. Animals*, 10: 1726-1746
- Consejo Canadiense de Protección de los Animales (1998): Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación. Editores: Ernest D. Olfert, DMV; Brenda M. Cross, DMV; y A. Ann McWilliam. ISBN: 0-919087-31-0
- Flecknell P (2015): *Laboratory Animal Anaesthesia*. Fourth Edition Elsevier Inc 350 pp ISBN: 9780128000366
- Flecknell P (2018): Rodent analgesia: assessment and therapeutics. *Review. The Veterinary Journal* 232: 70-77
- Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (2011): Institute for Laboratory Animal Research, National Research Council, Eighth Edition. <http://www.nap.edu/catalog/12910.html>
- Hampshire V, Robertson S (2015): Using the facial grimace scale to evaluate rabbit wellness in post-procedural monitoring. *Lab Animal* 44: 259-260
- IASP (1979): Subcommittee on Taxonomy. Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP Subcommittee on Taxonomy. *Pain*;6(3):249-52
- IRAC [Interagency Research Animal Committee]. (1985): US Government Principles for Utilization and Care of Vertebrate Animals Used in Testing, Research and Training. Prepared by the Interagency Research Animal Committee, National Institutes of Health (Lead), p 81-83 in *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. (NTH publication no. 85-23). Washington DC: US Department of Health and Human Resources.
- Jirkof P (2017): Side effects of pain and analgesia in animal experimentation. *Review. LabAnimal* Vol.46 (4): 123- 128
- Langford D, Bailey A, Chanda M, Clarke S, Drummond T, Echols S, Click S, Ingrao J, Klassen T, Croix M, Matsumiya L, Sorge R, Sotocinal S, Tabaka J, Wong D, Maagdenberg A, Ferrari M, Craig K, Mogil J (2010): *Nature Methods* Vol.7 (6) : 447-453.
- McLennan K, Miller A, Dalla Costa E, Stucke D, Corke M, Broom D, Leach M (2019): Conceptual and methodological issues relating to pain assessment in mammals: The development and utilisation of pain facial expression scales. *Applied Animal Behaviour Science* 217: 1-15.
- Parasuraman S, Raveendran R, Kesavan R (2010): Blood sample collection in small laboratory animals. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics* vol. 1 (2): 87-93. DOI: 10.4103/0976-500X.72350

- Regueiro-Purriños M, Ajenjo J, Perez A, García-Gómez M, Altonaga J, Orden G, Fernández-Vázquez F (2013): Anestesia en el modelo animal de investigación cardiovascular. *Rev Esp Cardiol Supl* 13(E): 47-56
- Remie, R. (2016): Anaesthesia in Laboratory Animals. En: *Rodent Model as Tools in Ethical Biomedical Research* Cap 9: p113-127, Publ: Springer Nature
- Rivera E (2009): Analgesia, anestesia e eutanásia em roedores, lagomorfos, cães e suínos. En *Animais na Pesquisa e no Ensino: aspectos éticos e técnicos* Cap 4: 198-216
- Sotocinal S, Sorge R, Zaloum A, Tuttle A, Martin L, Wieskopf J, Mapplebeck J, Wei P, Zahn S, McDougall J, King O, Mogil J (2011): The Rat Grimace Scale: A partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Molecular Pain* 2011, 7: 55-65
- Stokes, W (2000): Reducing Unrelieved Pain and Distress in Laboratory Animals Using Humane Endpoints. *ILAR Journal*, Volume 41(2): 59-61
- Vidal Fuentes J (2020): Versión actualizada de la definición de dolor de la IASP: un paso adelante o un paso atrás. *Revista de la Sociedad Española del Dolor RESED*: 232-233. DOI: 10.20986/resed.2020.3839/2020
- Weary D, Niel L, Flower F, Fraser D (2006): Identifying and preventing pain in animals. *Applied Animal Behaviour Science* 100: 64-76
- Wolfensohn S, Lloyd M (2013): *Handbook of laboratory animal management and welfare*, 4th Edition. Oxford University Press 390 pp
- Zimmerman M., (1986): Physiological mechanisms of pain and its treatment. *Klinische Anaesthesiol Intensive Ther*, 32:1-19

Capítulo VIII.

Eutanasia y necropsia

Eutanasia

Los temas relacionados con los animales ya no son socialmente invisibles y, cada vez más, se dedica mayor atención a comprender el significado moral de las experiencias de los animales y para tener en cuenta su bienestar. Existe debate sobre si la eutanasia describe de forma apropiada la muerte de algunos animales al final de los experimentos biológicos, por lo que es que existen guías específicas para ello (AVMA Guidelines, 2020).

Si bien la eutanasia se relaciona con matar, no es simplemente un eufemismo para la palabra matar. La palabra eutanasia cubre un subconjunto de las diversas formas y momentos en que los sujetos son sacrificados, y solo aquellas muertes que podrían considerarse una «buena muerte» merecen el término. La palabra se usa en el contexto médico humano, donde ha habido una larga discusión sobre si se debe sacrificar a los pacientes humanos, y en el contexto veterinario, donde la atención se ha centrado en cómo sacrificar a los animales (Carbone 2014; Valentim 2016).

Además, los métodos de eutanasia deben ser simples de aplicar y producir resultados consistentes. Puede ser difícil, incluso imposible, satisfacer por completo todos estos objetivos en todos los casos, más aún

debido a los desafíos para identificar resultados importantes (por ej., angustia, dolor, atractivo estético) (Valentim 2016; Laferriere 2020); generando también controversias entre las guías más importantes al momento de clasificar los diferentes métodos de eutanasia como veremos en este capítulo.

La eutanasia es una preocupación crítica para el bienestar de los animales de laboratorio, aunque solo sea porque la gran mayoría de los animales de laboratorio son sacrificados (Carbone 2014; Valentim 2016). La eutanasia en los animales de experimentación se da por diferentes motivos que incluyen la necesidad de células o tejidos para la investigación *in vitro*; la obtención de sangre, tejidos u otras muestras en ciertas etapas de un estudio o al final del mismo; para estudios de patología o diagnóstico veterinario; para prevenir el dolor y la angustia inevitables cuando se alcanza el punto final aprobado; o para sacrificar animales que ya no se necesitan (por ej., de un programa de reproducción) y no se les puede encontrar otro uso consistente con el principio de las 3R's (CCAC Guidelines 2010; Valentim 2016; Laferriere 2020).

Punto final humanitario

Muchos de los procedimientos de experimentación animal causan sufrimiento a los animales (incluso su estabulación debería ser a veces tenida en cuenta) y, como toda clase de sufrimiento podría describirse como inhumana; el punto final podría quizá considerarse como *lo menos inhumano* (Balls, 1999). Un animal puede tardar varios días en morir y por ello debe establecerse un momento de punto final sustitutivo. Se deben determinar los signos clínicos que preceden irrevocablemente a la muerte y utilizarlos para decidir el momento de punto final pre-letal (Morton, 2005), y establecer criterios de punto final cuando se diseña un experimento.

Una definición de criterio de punto final podría ser la siguiente: «indicador más temprano en un experimento con animales de un nivel de dolor o distrés tal que, independientemente de los objetivos científicos del estudio, debe considerarse para evitar o limitar dicho dolor o distrés tomando acciones como aliviar al animal de dicho malestar, retirarlo del estudio o, en último caso sacrificarlo humanitariamente». El objetivo de los criterios de punto final es, por tanto, limitar el sufrimiento de los animales a lo estrictamente necesario. Es moralmente obligatorio buscar indicadores de deterioro del animal para evitar dicho sufrimiento innecesario y, por supuesto, la muerte

(Hendriksen 1999; Morton 2005; Carbone 2014) (<https://www.humane-endpoints.info/es>).

Se pueden identificar cinco aspectos para decidir el punto final (European Commission 1997; Morton 2005):

- Cuando el animal no va a proporcionar más información científica útil por estar muy afectado fisiológicamente; lo cual puede estar relacionado, pero no siempre, con la variable que está siendo estudiada.
- Cuando el animal no va a proporcionar información científicamente útil, porque está psicológicamente perturbado. A veces está relacionado, pero no siempre, con la variable que está siendo estudiada.
- Cuando el sufrimiento causado a los animales durante el estudio es más alto de lo previsto y la proporcionalidad entre el costo / beneficio se pierde, por lo que el daño realizado al animal pesa más que el beneficio que está siendo buscado.
- Cuando el nivel de sufrimiento es tan alto, que es simplemente un error causar este grado de daño al animal. En la legislación del Reino Unido y las guías de la OCDE esto sería denominado *daño y angustia severos*.
- Cuando un alto grado de sufrimiento puede estar justificado, pero no hay necesidad de

causarlo ya que puede predecirse el punto final científico de modo previo.

¿Qué es la eutanasia?

El nombre Eutanasia proviene del griego, *Eu*: buena y *Thanatos*: muerte (buena muerte). Se refiere a la forma humanitaria de sacrificar animales con el menor sufrimiento posible (angustia, dolor y miedo) (European Commission 1997; Hedenqvist 2003; Álvarez Gómez 2008; CCAC Guidelines 2010; Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 2011; Carbone 2014; Valentim 2016; AVMA Guidelines 2020). Cuando la eutanasia es la opción preferida como punto final, la técnica empleada debe dar como resultado una rápida pérdida de conciencia seguida de un paro cardíaco o respiratorio y, en última instancia, una pérdida de la función cerebral. Además, el manejo del animal y la técnica de eutanasia deben minimizar la angustia experimentada por el animal antes de perder el conocimiento (European Commission 1997; CCAC Guidelines 2010; Guide for The Care and Use Of Laboratory Animals 2011; Valentim 2016; AVMA Guidelines 2020).

Según la Animal Welfare Act Regulations (AWR) la eutanasia se define como «la destrucción humanitaria de un animal lograda mediante un método que produce una pérdida rápida de la conciencia y la muerte subsiguiente sin evidencia de dolor o angustia, o un método que utiliza anestesia producida por un agente

que causa la pérdida del conocimiento sin dolor y posterior muerte». Estas regulaciones de la AWR afirman que la eutanasia es necesaria para el bienestar de los animales: «Los animales que de otro modo experimentarían un dolor intenso o crónico o una angustia que no se puede aliviar serán sacrificados sin dolor al final del procedimiento o, si corresponde, durante el procedimiento» (Carbone, 2014).

Existen guías que establecen los criterios para la eutanasia en las que se especifican los métodos y agentes apropiados y tienen por objeto ayudar al momento de realizarla. Las Guías reconocen que la eutanasia es un proceso que involucra más de lo que le sucede a un animal en el momento de su muerte. Además de delinear los métodos y agentes apropiados, estas guías también reconocen la importancia de considerar y aplicar prácticas apropiadas previas a la eutanasia (por ej., sedación) y de manipulación de animales, así como la atención a la eliminación de los restos de los animales. (Morton 2005; CCAC Guidelines 2010; Guide for The Care and Use of Laboratory Animals 2011; AVMA Guidelines 2020).

Al tomar la decisión del punto final, quienes están a cargo de definirla apelan a los índices de bienestar o calidad de vida. Los científicos han descrito que el bienestar tiene 3 componentes: que el animal funcione bien, se sienta bien y tenga la capacidad de realizar comportamientos (adaptaciones innatas) específicos de la especie. Un animal tiene un buen bienestar si, en conjunto, su vida tiene un valor positivo para él (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 2011; AVMA Guidelines 2020).

Los investigadores, los comités de ética animal y los veterinarios optan por sacrificar a los animales de experimentación por tres motivos principales (Carbone 2014; Valentim 2016; AVMA Guidelines 2020):

1. la eutanasia es un componente integral de la investigación y produce muestras que se deben estudiar *post mortem*;
2. la eutanasia es un requisito humanitario para terminar o prevenir el sufrimiento animal que no puede ser manejado por otros medios, y
3. la eutanasia se elige por defecto porque no hay un uso presente o futuro planificado para un determinado animal en un momento en particular.

Quienes realizan o supervisan la eutanasia deben evaluar el potencial de angustia animal debido a la incomodidad física, entornos sociales anormales, entornos físicos novedosos, feromonas u olores de animales cercanos o previamente sacrificados, la presencia de humanos u otros factores (incluido el impacto sobre el medio ambiente y otros animales). Además, se deben considerar la seguridad humana y las percepciones, la disponibilidad de personal capacitado, las posibles preocupaciones sobre enfermedades infecciosas, la conservación u otros objetivos de la población animal, la supervisión reglamentaria que puede ser específica de la especie, el equipo y las instalaciones disponibles, las opciones de eliminación, la toxicidad secundaria potencial y otros factores. La seguridad humana es de suma importancia, y se debe disponer de los equipos, protocolos y conocimientos

de seguridad adecuados antes de manipular a los animales (Gagea-Iurascu 2012; CCAC Guidelines 2010; AVMA Guidelines 2020).

El punto final humanitario también es esencial en circunstancias inesperadas, como enfermedades y lesiones que pueden requerir la finalización del experimento en animales individuales, o incluso cohortes completas, antes de que se alcancen los puntos finales del estudio y los datos utilizables. En algunos casos, el imperativo de refinar los experimentos y establecer límites al sufrimiento animal puede requerir el uso de más animales, si solo un subconjunto alcanzará los puntos finales experimentales deseados. La Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio habla sobre el principio ético de menor sufrimiento para más animales sobre mayor sufrimiento para menos, afirmando el equilibrio entre refinamiento versus reducción, «la reducción no debe ser una justificación para reutilizar un animal», o animales que ya se han sometido a procedimientos experimentales, en especial si el bienestar de los animales se viera comprometido (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 2011; Carbone 2014).

Resumen de los Principios Generales Sobre Eutanasia²

1. Cada vez que se va a quitar la vida de un animal este se debe tratar con el más alto grado de respeto.
2. Al realizar la eutanasia, la intención debe ser que la muerte del animal sea lo más libre de angustia y dolor posible. Por lo tanto, se debe seleccionar el método que probablemente cause la menor angustia y dolor al animal, de acuerdo con la naturaleza del protocolo experimental.
3. La eutanasia debe dar como resultado una pérdida rápida de la conciencia, seguida de un paro respiratorio y cardíaco y, en última instancia, la pérdida de todas las funciones cerebrales.
4. La eutanasia debe tener como objetivo minimizar el dolor y la angustia experimentados por el animal antes de la pérdida del conocimiento. Cuando sea apropiado, la restricción debe usarse de tal manera que se minimicen el dolor y la angustia asociados con todo el proceso.
5. Los métodos utilizados para la eutanasia deben ser apropiados para la especie, la edad y el estado de salud del animal.

² European Commission 1997; CCAC Guidelines 2010; Carbone 2014; AVMA Guidelines 2020

6. La muerte debe verificarse después de la eutanasia y antes de la eliminación del animal.
7. El personal responsable de realizar la eutanasia debe estar capacitado para realizarla de la manera más humana y eficaz; reconocer signos de dolor y angustia en especies relevantes; y reconocer y confirmar la inconsciencia, y posteriormente la muerte, en especies relevantes.
8. Las respuestas psicológicas humanas a la eutanasia deben tenerse en cuenta al seleccionar el método de eutanasia, pero no deben prevalecer sobre las consideraciones de bienestar animal.
9. Los CEUA son responsables de la aprobación del método de eutanasia para cualquier estudio que involucre el uso de animales. Esto incluye la eutanasia como parte del protocolo experimental, así como la eutanasia para los animales que experimentan dolor y angustia irreversibles o que se acercan a los criterios de valoración previamente acordados.

Métodos de eutanasia

Para evaluar un método de eutanasia se deben considerar los siguientes criterios (CCAC Guidelines 2010; Carbone 2014; AVMA Guidelines 2020):

1. Capacidad para inducir la pérdida de conciencia y muerte con el mínimo dolor y *distress*.
2. Tiempo requerido para inducir la pérdida de conciencia.
3. Fiabilidad.
4. Seguridad del personal.
5. Irreversibilidad.
6. Compatibilidad con el uso y propósito previsto del animal.
7. Efecto emocional documentado en operadores u observables.
8. Compatibilidad con la evaluación, el examen o el uso subsiguientes del tejido.
9. Disponibilidad de fármacos y potencial abuso por humanos.
10. Compatibilidad con la especie, edad y estatus sanitario.
11. Posibilidad de mantener los equipos necesarios en condiciones de trabajo apropiado.
12. Requerimientos legales.
13. Impacto ambiental del método utilizado o disposición final de los restos del animal.

A su vez los métodos de eutanasia se clasifican como (Álvarez Gómez 2008; CCAC Guidelines, 2010; AVMA Guidelines 2020):

1. Aceptables: son los que producen una muerte humanitaria cuando se utilizan como único medio de eutanasia.
2. Condicionalmente aceptables: son aquellas técnicas que pueden requerir el cumplimiento de ciertas condiciones para producir consistentemente una muerte humanitaria, pueden tener un mayor potencial de error del operador o peligro para la seguridad, no están bien documentadas en la literatura científica o pueden requerir un método secundario asegurar la muerte. Estos son equivalentes a métodos aceptables cuando se pueden cumplir todos los criterios para la aplicación de un método.
3. Inaceptables: son aquellos métodos que se consideran inhumanos bajo cualquier condición o que se determinó que representaban un riesgo sustancial para el ser humano que aplica la técnica.

Además, dentro de esta clasificación tendremos dos tipos de métodos según la forma en que se lleve a cabo la eutanasia. Como veremos ellos podrán ser utilizados como único método de eutanasia o ambos en combinación según las necesidades del procedimiento:

1. Métodos físicos: persiguen la pérdida rápida de la consciencia mediante un trauma cerebral. Pueden ser desagradables para el operador y observadores, pero realizados por personal experimentado son rápidos, seguros y probablemente inducen un dolor y angustia mínimos en los animales. Por el contrario, en manos inexpertas se puede producir un dolor y angustia elevados. Presentan la ventaja de no requerir de sustancias que pudieran interferir con los objetivos del experimento (European Commission 1997; Hedenqvist 2003; Álvarez Gómez 2008; Valentim 2016; AVMA Guidelines 2020). A pesar de sus desafíos éticos, en ciertas situaciones los métodos físicos pueden ser la opción más apropiada para la eutanasia y el alivio rápido del dolor y el sufrimiento. Estos métodos incluyen: perno cautivo, disparo, dislocación cervical, decapitación, electrocución, irradiación de microondas de haz enfocado, exanguinación, maceración, aturdimiento (AVMA Guidelines, 2020).
2. Métodos químicos o farmacológicos: la mayoría se basan en la administración de una sobredosis de agentes anestésicos que producen inconsciencia, fallo cardiovascular, respiratorio y muerte. Agentes químicos que produzcan la muerte sin una inconsciencia previa, no son aceptados (agentes paralizantes, cloruro potásico, etc.) (European Commission 1997; Hedenqvist 2003; Álvarez Gómez 2008).

En la tabla 13 del anexo III se detalla la clasificación de los métodos de eutanasia.

La responsabilidad por el bienestar de los animales de laboratorio no cesa cuando se toma la decisión de punto final. Una vez que se ha identificado que un animal requiere eutanasia, los investigadores deben estar listos para actuar rápidamente. La demora de días o incluso algunas horas mientras el personal prepara los reactivos, programa la asistencia técnica o se prepara para la eutanasia puede aumentar el sufrimiento de los animales (Carbone, 2014).

Varios métodos de eutanasia conllevan diferentes riesgos en el bienestar de los animales (miedo, dolor, disnea, inmovilización) en diferentes etapas del procedimiento (antes, durante o después del procedimiento) (Carbone, 2014). La selección del método apropiado en cualquier situación dependerá de la especie, número de animales, medios disponibles para sujeción de los animales y habilidad del personal entre otras consideraciones. Una vez realizada la eutanasia, se debe verificar la muerte examinando el animal cuidadosamente para comprobar la ausencia de signos vitales. Solo cuando se tenga la seguridad de que ya no llega sangre al cerebro y hayan cesado la respiración y la actividad refleja, se debe considerar muerto al animal (European Commission 1997; CCAC Guidelines, 2010; Gagea-Iurascu 2012; Carbone 2014; AVMA Guidelines 2020).

Al igual que con muchos otros procedimientos que involucran animales, algunos métodos de eutanasia requieren el manejo físico del animal. El grado de control y el tipo de restricción requerida serán determinados por la especie, raza y tamaño del animal involucrado; el grado de domesticación, tolerancia

a los humanos, el nivel de excitación y experiencia previa en el manejo del animal; la presencia de lesiones o enfermedades dolorosas; el entorno social del animal; y el método de eutanasia y la competencia de la(s) persona(s) que realiza(n) la eutanasia. La experiencia en la sujeción humanitaria de las especies de animales que van a ser sometidas a eutanasia es importante, para garantizar que el dolor y la angustia se minimicen. El entrenamiento y la experiencia deben incluir la familiaridad con el comportamiento normal de las especies en cuestión, así como una apreciación de cómo el manejo y la sujeción afectan ese comportamiento y una comprensión del mecanismo por el cual la técnica seleccionada induce la pérdida del conocimiento y la muerte. La eutanasia solo debe intentarse cuando los fármacos y suministros necesarios estén disponibles para garantizar un procedimiento sin problemas. Los últimos minutos de vida de un animal no deben gastarse luchando contra congéneres desconocidos o luchando contra el manejo humano inexperto (Álvarez Gómez, 2008; CCAC Guidelines, 2010; Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011; Carbone 2014; AVMA Guidelines 2020).

Los animales que se someten a la eutanasia pueden liberar feromonas que pueden causar que sus congéneres experimenten una angustia indebida; por lo tanto, se recomienda que los animales no sean sacrificados en presencia de otros que no se sacrificarán en ese momento (Gagea-Iurascu, 2012).

Consideraciones especiales

Es posible que los mamíferos altriciales (nacen ciegos, conductos auditivos cerrados, sin pelo, movilidad limitada) no sean plenamente conscientes hasta algunos días después del nacimiento, un ejemplo de ellos son los neonatos de roedores. La especificidad en las recomendaciones de eutanasia en fetos y neonatos se basa en su desarrollo neural. Los neonatos de ratas y ratones nacen neurológicamente inmaduros, y sus vías aferentes del dolor no están bien desarrolladas hasta después del día 5 a 7 del nacimiento ya que el desarrollo cortical ocurre más tarde. Debido a estas características no están incluidos en las guías actuales de eutanasia, que indican cinco días o más como el inicio de la percepción. Por el contrario, las crías que nacen muy desarrolladas como las de cobayos, son tratados como adultos al momento de definir el método de eutanasia. Además, los neonatos presentan dos características para tener en cuenta: metabolizan de forma muy lenta los agentes utilizados para eutanasia y presentan una importante resistencia a la hipoxia. Por lo que, por ejemplo, es necesaria una exposición muy prolongada al dióxido de carbono (hasta 50 minutos) en comparación con los adultos (Gagea-Iurascu 2012; Carbone 2014; Valentim 2016; AVMA Guidelines 2020). El enfriamiento gradual se considera condicionalmente aceptable para los neonatos altriciales hasta aproximadamente los siete días, y la congelación rápida hasta el comienzo de la sensibilidad, hasta los cinco días (Carbone 2014; Valentim 2016).

Los fetos en el útero de cualquier especie o etapa de desarrollo se consideran no sintientes siempre que permanezcan en el útero y no estén expuestos al oxígeno (Carbone 2014; AVMA Guidelines 2020). Los datos neurofisiológicos y de comportamiento actuales muestran que los fetos de mamíferos son insensibles e inconscientes durante el 75-80 % del embarazo. Después de eso, un feto podría ser sensible y se volvería consciente si fuera extraído del útero. Mientras aún está en el útero, varios neuroinhibidores actúan sobre la corteza cerebral fetal y la mantienen en un estado inconsciente (Mellor 2010; Carbone 2014; Valentim 2016). Por lo tanto, los fetos en etapa tardía extraídos del útero deben sacrificarse de inmediato, pero si se mantienen en el útero sin abrir durante un período lo suficientemente largo como para morir de hipoxia, no desarrollan la conciencia ni sufren (Carbone 2014).

En la Tabla 14 del anexo III se describen los diferentes métodos de eutanasia en roedores.

Métodos de eutanasia aceptables

Métodos físicos

1. Disparo: es el método más empleado en mamíferos y reptiles de gran tamaño. Se realiza en la cabeza destruyendo el cerebro (AVMA Guidelines, 2020). El procedimiento se debe

realizar al aire libre y en un área de acceso restringido. Una variante más segura que el disparo con bala convencional, es la bala cautiva donde un émbolo sale del arma a gran velocidad produciendo concusión e inconsciencia. Posteriormente el animal debe ser exanguinado (European Commission, 1997; Álvarez Gómez, 2008; CCAC Guidelines, 2010; AVMA Guidelines 2020).

2. Bala Cautiva: el perno o bala cautiva se utiliza para la eutanasia de rumiantes, caballos, cerdos, conejos y alpacas. Su modo de acción es la conmoción cerebral y el arma utilizada tiene una cabeza ancha en forma de hongo que no penetra en el cerebro. La sujeción adecuada es importante para garantizar la colocación correcta del perno cautivo, es un método que solo produce el aturdimiento o confusión del animal por lo que una vez realizado el procedimiento se lo debe exsanguinar para completar la eutanasia. Es un método que permite obtener tejidos sin contaminación química (AVMA Guidelines, 2020). El aturdimiento efectivo depende del posicionamiento preciso de la pistola, el uso de la fuerza correcta del cartucho en relación con la especie y el tamaño del animal, el tamaño y la velocidad del cerrojo y el mantenimiento adecuado de la pistola. El sitio de penetración difiere con cada especie y, por lo tanto, este método solo debe ser realizado por personal debidamente capacitado (European Commission, 1997).

3. **Concusión:** con este método se produce aturdimiento por un golpe en la cabeza, el propósito del aturdimiento es volver al animal instantáneamente insensible al dolor al causarle una conmoción cerebral. Puede aplicarse a especies pequeñas como conejos y cobayos, resultando una técnica alternativa a la de la bala cautiva en animales de mayor tamaño. Tiene que ser realizado por una persona experta. Inmediatamente después del aturdimiento se realizará la exanguinación de los animales, o la lesión irreversible del corazón o del cerebro (European Commission, 1997; Álvarez Gómez, 2008; AVMA Guidelines 2020).
4. **Dislocación Cervical:** empleado en ratones y en otros roedores jóvenes (< a 300 g) y en conejos recién nacidos. Los roedores y conejos de mayor tamaño, pero de peso inferior a 1 kg deben estar sedados o aturdidos previamente. Para ratones y ratas, el pulgar y el índice se colocan a cada lado del cuello en la base del cráneo o, alternativamente, se presiona una varilla en la base del cráneo. Con la otra mano, se tira con rapidez de la base de la cola, provocando la separación de las vértebras cervicales del cráneo. Para conejos inmaduros, la cabeza se sostiene con una mano y las patas traseras con la otra. El animal se estira y el cuello se hiperextiende y gira dorsalmente para separar la primera vértebra cervical del cráneo. La aplicación correcta del método produce una lesión irreversible del tallo cerebral e inconsciencia inmediata. Los datos sugieren que la actividad eléctrica en el cerebro persiste durante 13 segundos después de la dislocación cervical en ratas, y a diferencia de la decapitación, la exanguinación rápida no contribuye a la pérdida del conocimiento. Es un método estéticamente desagradable para el operador, recomendándose la sedación o anestesia previa del animal. Efectuado por personal bien entrenado es un método rápido y efectivo que causa un daño importante en el tronco encefálico y la inconsciencia instantánea (European Commission, 1997; Álvarez Gómez, 2008; AVMA Guidelines 2020).
5. **Decapitación:** implica, a diferencia de la dislocación cervical, la separación total del cuello y la cabeza. Se usa en roedores y conejos pequeños. Este método requiere de una guillotina o instrumento cortante, que realice la operación rápidamente y en un solo intento. Proporciona un medio para recuperar tejidos y fluidos corporales que no están contaminados químicamente y tejido cerebral intacto para su estudio (European Commission, 1997; Álvarez Gómez, 2008; AVMA Guidelines 2020). Aunque se ha demostrado que la actividad eléctrica en el cerebro persiste durante 13 a 14 segundos después de la decapitación, estudios recientes indican que esta actividad no implica que se perciba dolor y, de hecho, concluyen que la pérdida de conciencia se desarrolla rápidamente. Los potenciales evocados visualmente en ratones se redujeron más rápidamente después de la dislocación cervical en comparación con la decapitación (AVMA Guidelines, 2020). A pesar de considerarse un método aceptable, es recomendable el uso de otras alternativas. Ha habido mucho debate sobre el tiempo que transcurre hasta la pérdida del conocimiento de la cabeza decapitada en vertebrados de sangre fría y caliente y se sugiere anestésiar o sedar el animal previamente. Sin embargo, la manipulación e inyección de sedantes o anestésicos antes de la decapitación podría aumentar el estrés previo a la eutanasia y, por lo tanto, no se considera bueno para el bienestar del animal. Puede ser estéticamente desagradable para el operador (European Commission, 1997).
6. **Irradiación con Microondas:** implica enfocar el haz de microondas con precisión en una parte específica del cerebro, se emplea en animales de peso menor a 300 g. Es un método empleado en neurobiología para fijar los metabolitos del cerebro sin perder la integridad anatómica del mismo. Este es el método más eficaz para fijar el tejido cerebral in vivo para el ensayo posterior de productos químicos enzimáticamente lábiles. Requiere la utilización de un equipamiento específico, siendo los aparatos de uso doméstico inadecuados para este fin (European Commission 1997; Álvarez Gómez 2008; Carbone 2014; AVMA Guidelines 2020). Es un método que requiere personal con experiencia en el procedimiento, pero cuando se realiza correctamente la muerte ocurre en milisegundos. La pérdida de conciencia se logra en menos de 100 milisegundos y la muerte en menos de 1 segundo (AVMA Guidelines, 2020). Se debe tener cuidado para garantizar la posición correcta del haz

de microondas, pero el tiempo necesario para inmovilizar al animal debe reducirse al mínimo para reducir el estrés antes de la eutanasia. La radiación de cuerpo entero se ha utilizado con éxito en ratones a temperaturas de 47 a 49°C y los animales mueren en menos de 1 segundo y es aceptable. No es un método de rutina para eutanasia (European Commission, 1997).

Métodos químicos:

estos incluyen agentes inhalatorios e inyectables

I) *Anestésicos inhalatorios*: son todos aquellos agentes que pueden suministrarse en forma gaseosa. Se emplean preferentemente en animales de pequeño tamaño, como los roedores introducidos en cámaras o cajas con el gas (Álvarez Gómez 2008; Valentim 2016). Los agentes anestésicos inhalatorios deben administrarse para inducir efectos rápidos, controlados y en condiciones vigiladas con equipo calibrado (CCAC Guidelines, 2010). Los vapores y gases inhalados requieren una concentración crítica dentro de los alvéolos y la sangre para producir efecto; por lo tanto, todos los métodos que utilizan anestésicos inhalatorios tienen el potencial de afectar negativamente el bienestar animal porque el inicio de la inconsciencia no es inmediato. A pesar de ello, los anestésicos inhalatorios continúan administrándose porque los beneficios asociados con su uso superan con creces cualquier angustia o aversión que puedan causar (Carbone 2014; Valentim 2016; AVMA Guidelines 2020). Generalmente una sobredosis de estos agentes resulta en un método efectivo de

eutanasia para muchas especies. Sin embargo, el tiempo hasta la muerte puede ser bastante largo y, por lo tanto, se recomienda el uso de un segundo procedimiento para asegurar la muerte del animal una vez que el animal esté inconsciente como resultado de la anestesia. En roedores y otras especies el uso de anestésicos inhalantes puede ser aversivo y estresante. El uso en combinación con un sedante puede estar indicado en situaciones en las que la administración del calmante produce un estrés mínimo. Además, los agentes anestésicos gaseosos presentan peligros para la salud de los seres humanos si no se eliminan adecuadamente. Los anestésicos inhalatorios no son apropiados para especies acuáticas o especies que aguantan la respiración. Se debe tener en cuenta que todos los gases pueden no ser perfectos y siempre tener una desventaja asociada (CCAC Guidelines, 2010; Valentim 2016).

Para la eutanasia se utilizan sobredosis de anestésicos inhalatorios. Para ello los animales pueden colocarse en un receptáculo cerrado que contenga algodón o gasa empapada con una cantidad adecuada de anestésico líquido o el vapor del anestésico puede introducirse desde un vaporizador de precisión. El vapor anestésico se inhala hasta que cesa la respiración y sobreviene la muerte (Carbone 2014; AVMA Guidelines 2020).

Según Carbone 2014 y AVMA Guidelines 2020 los anestésicos inhalatorios presentan ventajas y desventajas, a saber:

Ventajas

- a. Son particularmente útiles para la eutanasia de animales más pequeños (< 7 kg) o para animales en los que la venopunción puede ser difícil.
- b. Pueden administrarse por métodos diferentes según las circunstancias y el equipo disponible (por ej., máscara facial, gota abierta donde no se permite que el animal entre en contacto directo con el líquido anestésico, vaporizador de precisión, recipientes rígidos o no rígidos).
- c. Pueden ser útiles como único agente de eutanasia o como parte de un proceso de dos pasos, donde los animales primero quedan inconscientes mediante la exposición a agentes anestésicos inhalatorios y luego se sacrifican mediante un método secundario.

Desventajas

- a. Pueden ser aversivos en los conejos y roedores de laboratorio y para otras especies. Los animales pueden luchar y ponerse ansiosos durante la inducción de la anestesia, y exhibir comportamientos de escape antes del inicio de la inconsciencia. La aversión aprendida a los anestésicos inhalados ocurre en roedores. Si se produce apnea o excitación, el tiempo hasta la pérdida de la conciencia puede prolongarse.

- b. Debido a los límites de diseño en la salida de vapor, los vaporizadores anestésicos de precisión pueden asociarse con una constante de tiempo de lavado más prolongada y, por lo tanto, un tiempo de inducción más prolongado; el tiempo hasta la muerte puede prolongarse ya que el oxígeno se usa comúnmente como gas portador de vapor.
- c. El personal y los animales pueden resultar lesionados por la exposición a estos agentes. Existe un potencial reconocido de abuso humano de los anestésicos inhalatorios.
- d. Como se absorben grandes cantidades de anestésicos inhalatorios y cantidades sustanciales permanecen en el cuerpo durante días, incluso después de una aparente recuperación. El uso de estos anestésicos para la eutanasia no es adecuado para animales destinados a la producción de alimentos debido a la posibilidad de que queden residuos en los tejidos.

A continuación, se listan algunos anestésicos inhalatorios aceptables para su uso en eutanasia: (Carbone 2014; AVMA Guidelines 2020):

- 1. *Halotano*: induce la anestesia de forma rápida y es un agente eficaz para la eutanasia, es menos irritante y no tiene olor fuerte (Valentim, 2016).
- 2. *Isoflurano*: es menos soluble que el halotano e induce la anestesia más rápido que él, por lo que es de uso común en la mayoría de los

laboratorios (Valentim, 2016). Sin embargo, tiene un olor desagradable y el inicio de la inconsciencia puede retrasarse debido a la contención de la respiración. Debido a su menor potencia, el isoflurano también puede requerir mayor cantidad de fármaco para la eutanasia, en comparación con el halotano (Carbone 2014; AVMA Guidelines 2020).

II) Agentes no inhalatorios: las principales vías de administración son la inyección parenteral, la aplicación tópica y la inmersión (Carbone 2014; AVMA Guidelines 2020). Idealmente, los anestésicos se deben inyectar por vía IV a menos que el animal sea demasiado pequeño, en cuyo caso se debe realizar una inyección IP. Cuando se utiliza la vía IP, los operadores deben ser conscientes de la necesidad de asegurarse de que el pH de los medicamentos formulados para la administración no sea irritante (CCAC Guidelines 2010; Carbone 2014). Las vías IM o SC no son adecuadas porque inducen el efecto anestésico muy lentamente y requieren dosis superiores, y otras vías como la intraarterial, intracardíaca o intrapulmonar se consideran inaceptables porque producen angustia y dolor (Álvarez Gómez, 2008). Cuando se determina si un fármaco y una vía de administración en particular son apropiados para la eutanasia, se debe considerar la especie involucrada, la farmacodinamia del agente químico, el grado de restricción física o química requerida, los peligros potenciales para el personal, y los peligros potenciales para el medio ambiente derivados de los residuos químicos (AVMA Guidelines, 2020).

Las vías de administración pueden variar dependiendo de la especie; estas pueden ser:

- a. *Vía parenteral*: es uno de los métodos más rápidos y confiables. Suele ser el método de elección cuando se puede realizar sin causar miedo o angustia al animal. Administrados de forma apropiada, los agentes utilizados para eutanasia dan como resultado una pérdida suave de la conciencia antes del cese de la función cardíaca o respiratoria, minimizando el dolor y la angustia del animal. La administración IV del agente seleccionado, va directamente al sistema vascular, lo que permite una rápida distribución del agente al cerebro o a los centros neurales, lo que resulta en una rápida pérdida de conciencia. Cuando es probable que la inmovilización necesaria para administrar por vía IV a un animal le cause mayor estrés o represente un riesgo indebido para el operador, se debe usar sedación, anestesia o una ruta o método de administración alternativo aceptable. Cuando la vía IV es poco práctica o imposible, la vía IP es la de elección siempre que el agente a utilizar sea no-irritante (Álvarez Gómez 2008; AVMA Guidelines 2020). Las inyecciones IM, SC, intratorácicas, intrapulmonares y otras inyecciones no vasculares son vías de administración inaceptables para los agentes de eutanasia inyectables en animales conscientes (AVMA Guidelines, 2020).
- b. *Administración oral*: la vía oral tiene varias desventajas para la administración de agentes de eutanasia, incluida la falta de fármacos y dosis

establecidas, la variabilidad en la biodisponibilidad del agente y la velocidad de absorción, la posible dificultad de administración (incluida la posibilidad de aspiración) y la posibilidad de pérdida del agente por vómito o regurgitación (en especies que son capaces de estas funciones). Por estas razones, la vía oral es inaceptable como único medio de eutanasia. Sin embargo, la vía oral es un medio apropiado para administrar sedantes antes de la administración de agentes de eutanasia parenterales (Álvarez Gómez 2008; AVMA Guidelines 2020).

- c. *Inmersión*: debido a que los animales acuáticos tienen características fisiológicas y anatómicas propias, los métodos óptimos para la eutanasia varían. En muchas situaciones, la inmersión de animales acuáticos en agua que contiene agentes de eutanasia es la mejor manera de minimizar el dolor y la angustia. La respuesta de los animales acuáticos a los agentes de inmersión puede variar según la especie, la concentración del agente y la calidad del agua, se deben tener en cuenta estos factores al seleccionar un agente de eutanasia apropiado. Estos agentes agregados al agua pueden ser absorbidos por múltiples vías, incluso a través de las branquias, por ingestión o a través de la piel (AVMA Guidelines, 2020). El uso de metasulfonato de triclaína (Ms 222 o TMS) es un método recomendado para anfibios y peces; sin embargo, es ácido y debe amortiguarse (Cakir y Strauch, 2005). El uso de métodos de inmersión (como TMS, benzocaína, etomidato, metomidato) debe ir seguido de un

método físico o químico para provocar la muerte cerebral. Los métodos de inmersión pueden ser débiles o ineficaces en peces que aguantan la respiración o respiran aire (CCAC Guidelines, 2010).

Agentes no inhalatorios utilizados para la eutanasia:

- a. *Barbitúricos y derivados*: los barbitúricos inyectables y sus combinaciones en general actúan rápida y suavemente para dejar inconscientes a los roedores. La dosis de eutanasia suele ser de 3 a 4 veces la dosis anestésica. El pentobarbital es el barbitúrico más utilizado en roedores, tiene un estrecho margen de seguridad, es potente, se puede formular como una solución concentrada de modo que se necesitan volúmenes relativamente pequeños y tiene un inicio de acción rápido cuando se administra por vía intravenosa. Además, el pentobarbital tiene una vida útil prolongada, es estable en solución y es económico debido a su larga vida útil y rapidez de acción. Cuando se administra en sobredosis para causar la muerte, se induce anestesia general, seguida de depresión de los centros respiratorio y cardiovascular del tronco encefálico, lo que lleva a un paro cardiorrespiratorio (Carbone 2014; AVMA Guidelines 2020; Laferriere 2020).
- b. *Combinación de agentes disociativos*: en roedores la ketamina y agentes disociativos similares deben usarse en combinación con un agonista de los receptores adrenérgicos α_2 , como la xilazina. En sobredosis, estos agentes pueden

causar la muerte; sin embargo, no se han establecido para la mayoría de las especies las dosis que consistentemente producirán la muerte. En ratones, la inyección de 100 μ L de una solución 10 mg:1 mg de ketamina:xilazina resultó en la muerte dentro de los 3 a 5 segundos posteriores a la finalización de la inyección. Por vía IP los agentes disociativos como la ketamina en combinación con agonistas de los receptores adrenérgicos α_2 en dosis 5 veces la dosis anestésica se utiliza para la eutanasia en roedores de laboratorio (Carbone 2014; AVMA Guidelines 2020). Como ventajas podemos destacar que: 1) son agentes fácilmente disponibles, 2) la combinación de estos agentes provoca una rápida pérdida del conocimiento. Pero también tiene desventajas como vimos en otros grupos: 1) no se han establecido las dosis que consistentemente producen una muerte rápida para la mayoría de las drogas y especies, 2) el costo de las dosis más altas de agentes requeridos para causar la muerte puede exceder sustancialmente el de un agente de eutanasia aprobado, 3) muchos agentes disociativos son sustancias controladas y su adquisición, almacenamiento y uso están restringidos, 3) algunos agentes inyectables pueden ser peligrosos para el personal humano si ocurre una exposición accidental, 4) no se ha determinado el impacto ambiental de los residuos de anestésicos inyectables en los restos de animales sacrificados. Como recomendación: en especies en que la dosis y vías para eutanasia están establecidas el uso de estos agentes es recomendable (AVMA Guidelines, 2020).

Las guías más importantes sobre métodos de eutanasia (la Canadiense CCAC Guidelines y la de Estados Unidos AVMA Guidelines) no alcanzan consenso en cuanto al uso de estos agentes. Mientras la AVMA clasifica la inyección intraperitoneal o intravenosa de derivados del ácido barbitúrico (o combinaciones de barbitúricos), así como la inyección de combinaciones de agentes disociativos, como los únicos métodos aceptables; la CCAC clasifica la inyección intraperitoneal de barbitúricos tamponados y diluidos, así como la sobredosis de anestésicos inhalantes como aceptables si son seguidos de otro método para asegurar la muerte (Laferriere, 2020).

Métodos de eutanasia condicionalmente aceptables

Algunos otros métodos de eutanasia de animales de experimentación pueden ser aceptables para su uso en ciertas circunstancias en las que exista una justificación científica y luego de la revisión y aprobación por parte de un CEUA y la garantía de que hay personal capacitado disponible para realizarla. Cuando se utilicen métodos condicionalmente aceptables que hayan sido aprobados por el CEUA, las condiciones de uso y capacitación del personal involucrado deben establecerse claramente en el protocolo (CCA Guidelines, 2010). Las pautas de AVMA (AVMA Guidelines, 2020) establecen además que «los métodos condicionalmente aceptables son equivalentes a métodos aceptables cuando se pueden cumplir

todos los criterios para la aplicación de un método» (Laferriere, 2020).

Métodos físicos

1. *Aturdimiento eléctrico*: se utiliza preferentemente en especies de tamaño medio, se realiza aplicando una corriente eléctrica con un equipo especial que dispone de unas tenazas cuyos extremos se colocan a ambos lados de la cabeza, es inaceptable el uso de cables de uso doméstico. Este método induce la muerte por fibrilación cardíaca, que provoca hipoxia cerebral. Hay que asegurar la aplicación correcta de los electrodos, ya que en caso contrario puede provocar sufrimiento en el animal. Es un método por el que se obtienen tejidos sin contaminación química (European Commission 1997; Álvarez Gómez 2008; AVMA Guidelines 2020). La eutanasia por aturdimiento eléctrico es condicionalmente aceptable porque requiere habilidades y equipos especiales que aseguren el paso de suficiente corriente a través del cerebro para inducir la pérdida del conocimiento e inducir espasmos epilépticos tónicos-clónicos. La inconsciencia debe inducirse antes o de forma simultánea a la fibrilación cardíaca, nunca debe ocurrir antes de que el animal quede inconsciente. Aunque condicionalmente aceptable si se cumplen los requisitos antes mencionados, las desventajas del método superan sus ventajas en la mayoría de las aplicaciones. La electroinmovilización que paraliza a un animal sin inducirlo primero a la

inconsciencia es extremadamente aversiva y es inaceptable (AVMA Guidelines, 2020).

2. *Inserción de aguja (pithing)*: se usa como un procedimiento complementario para asegurar la muerte de un animal que ha quedado inconsciente por otros medios, se emplea en peces, anfibios y reptiles introduciendo una aguja por el foramen magno hasta la base del cerebro, lesionándolo, requiere un conocimiento detallado de la anatomía de la especie en cuestión. Hay que realizarla en animales aturdidos o anestesiados y por una persona experimentada para producir una muerte rápida y libre de sufrimiento (European Commission 1997; Álvarez Gómez 2008; AVMA Guidelines 2020).
3. *Exanguinación*: la pérdida aguda y masiva sanguínea produce paro cardíaco, se realiza seccionando los grandes vasos. La sección es dolorosa y el animal debe estar anestesiado o inconsciente al realizarlo (Álvarez Gómez, 2008). Al igual que el anterior es un procedimiento complementario para asegurar la muerte del animal que ya está inconsciente. Debido a que la ansiedad se asocia con hipovolemia extrema, la exanguinación no debe utilizarse como único medio de eutanasia. Los animales pueden ser desangrados para obtener hemoderivados, pero solo cuando están sedados, aturdidos o anestesiados (Álvarez Gómez 2008; AVMA Guidelines 2020).

Métodos químicos

Agentes inhalatorios

1. *Enflurano*: es menos soluble en sangre que el halotano, pero debido a su menor presión de vapor y su menor potencia, las velocidades de inducción pueden ser similares a las del halotano. En planos anestésicos profundos, pueden ocurrir convulsiones. Es un agente eficaz para la eutanasia, pero la actividad convulsiva asociada puede perturbar al personal (Valentim 2016; AVMA Guidelines 2020)
2. *Sevoflurano*: es menos potente que el isoflurano o el halotano y tiene una presión de vapor más baja. Las concentraciones anestésicas pueden alcanzarse y mantenerse rápidamente, pero se requerirá mayor cantidad de fármaco para la eutanasia. Aunque el sevoflurano posee un olor menos desagradable que el isoflurano, algunas especies pueden luchar violentamente y experimentar apnea cuando el sevoflurano se administra mediante una máscara facial o una cámara de inducción. Al igual que el enflurano, el sevoflurano induce epilepsia (Valentim 2016; AVMA Guidelines 2020)
3. *Dióxido de carbono (CO₂)*: su inhalación causa acidosis respiratoria y produce un estado anestésico reversible al disminuir rápidamente el pH intracelular. La actividad neuronal basal se reduce poco después de la inhalación de CO₂ al 100 %. La inhalación de CO₂ a una

concentración del 7,5 % aumenta el umbral del dolor, y concentraciones del 30 % o mayores provocan una anestesia profunda y la muerte con una exposición prolongada. Los métodos para administrar CO₂ incluyen colocar a los animales directamente en una cámara cerrada y precargada con CO₂, o exponerlos a una concentración de CO₂ que aumenta gradualmente. El CO₂ tiene el potencial de causar angustia en los animales a través de 3 mecanismos diferentes: 1) dolor debido a la formación de ácido carbónico en las membranas respiratorias y oculares, 2) producción de la llamada falta de aire y sensación de ahogo, y 3) estimulación directa de los canales de iones dentro de la amígdala asociada con la respuesta de miedo. Se reportan diferencias sustanciales de especies y cepas. En ratas, la inconsciencia se induce en aproximadamente 12 a 33 segundos con 80 % a 100 % de CO₂ y de 40 a 50 segundos con 70 % del mismo. Como regla general, es preferible una muerte suave y prolongada a una muerte rápida, pero más angustiada. La exposición al CO₂ utilizando el método relleno gradual del contenedor causa aversión en los roedores a partir de una concentración de aproximadamente el 15 % y dura hasta el inicio de la inconsciencia. Si se utiliza una velocidad de desplazamiento gradual adecuada, los animales perderán el conocimiento antes de que las concentraciones de CO₂ se vuelvan dolorosas. Se ha observado que los anestésicos inhalatorios producen diferentes grados de aversión en roedores y se asocian con conductas de aversión, angustia y escape

durante la inducción anestésica. Como recomendación general, el CO₂ es condicionalmente aceptable para la eutanasia en aquellas especies en las que se puede minimizar la aversión o la angustia. Se recomienda el llenado gradual de la cámara con una tasa de desplazamiento de 30 % a 70 % del volumen de la cámara/min para roedores. Siempre que se utilicen métodos de desplazamiento gradual, el flujo de CO₂ se debe mantener durante al menos 1 minuto después del paro respiratorio. Sus ventajas son: 1) los rápidos efectos depresores, analgésicos y anestésicos del CO₂ están bien establecidos, 2) es fácilmente disponible en cilindros de gas comprimido, 3) es económico, no inflamable y no explosivo y representa un peligro mínimo para el personal cuando se usa con equipos diseñados adecuadamente. Sus desventajas son: 1) existen diferencias sustanciales y contradictorias en la respuesta a la inhalación de CO₂ entre y dentro de especies, cepas y razas, lo que dificulta generalizaciones amplias, 2) ya sea que se administre mediante métodos de prellenado o de desplazamiento gradual, puede ser aversivo para algunas especies y, por lo tanto, existe el potencial de causar angustia, 3) Debido a que es un gas más pesado que el aire, las capas de gas o el llenado incompleto de una cámara pueden permitir que los animales trepen o levanten la cabeza por encima de las concentraciones efectivas y eviten la exposición, 4) Los individuos inmaduros y algunas especies acuáticas y excavadoras pueden tener una tolerancia extraordinaria al CO₂, 5) La eutanasia por exposición a CO₂ con

suplementos de O₂ puede llevar más tiempo que la eutanasia por otros medios, 6) la inducción de pérdida de conciencia a concentraciones < 80 % puede producir lesiones pulmonares y del tracto respiratorio superior *post mortem* (Carbone 2014; Valentim 2016; AVMA Guidelines 2020; Laferriere 2020).

4. *Óxido nitroso (N₂O)*: es el menos potente de los anestésicos inhalatorios, generalmente se utiliza en combinación con otros anestésicos inhalatorios. El óxido nitroso usado solo creará una atmósfera hipóxica y favorecerá la combustión en altas concentraciones, como resultado, los animales pueden sufrir estrés o angustia antes de perder el conocimiento cuando se usa óxido nitroso como único agente. Se puede combinar hasta un 70 % de óxido nitroso con otros gases inhalatorios para acelerar el inicio de la anestesia. La adición de óxido nitroso a otros gases inhalatorios puede representar un refinamiento para la eutanasia. Por ejemplo, agregar 75 % de óxido nitroso a 5 % de isofluorano en oxígeno reduce el tiempo en producir el efecto deseado. Por lo expuesto solo puede utilizarse en combinación con otros gases (Álvarez Gómez 2008; AVMA Guidelines 2020).
5. *Monóxido de carbono (CO)*: es un gas incoloro e inodoro y no es inflamable ni explosivo en concentraciones <10 %. Su acción se produce ya que se combina fácilmente con la hemoglobina de forma irreversible y bloquea la captación de oxígeno por los eritrocitos formando

carboxihemoglobina. Precisamente porque es insidioso, difícil de detectar y altamente tóxico incluso en bajas concentraciones, es esencial un sistema de escape o ventilación eficiente para evitar la exposición accidental de humanos (Carbone 2014, Valentim, 2016; AVMA Guidelines 2020). Sus ventajas incluyen la inducción de pérdida de conciencia sin miedo y casi sin discomfort, dependiendo de la especie; y la muerte rápida si se utilizan concentraciones entre el 4 y 6 %. Pero también existen desventajas ya que es un agente aversivo para algunas especies, y que se deben tomar medidas de seguridad para prevenir y controlar la exposición del personal; los equipos eléctricos expuestos al CO (por ej., luces y ventiladores) deben estar libres de chispas y a prueba de explosiones (Carbone 2014; AVMA Guidelines 2020). En cuanto a la aversión, se ha visto en ratas que flujos intermedios y altos de CO provocan recumbencia en algunos animales que tenían la posibilidad de escapar a otra jaula además presentaron convulsiones y no estaba claro si estaban inconscientes al momento de suceder esto, mientras que otros animales presentaron agitación y cambios de comportamiento, todos elementos que sugieren aversión al CO (Valentim, 2016).

Métodos inaceptables de eutanasia

Métodos de eutanasia que no provocan una muerte rápida o que causen un trauma previo a la pérdida del conocimiento no se consideran métodos humanitarios de muerte o eutanasia.

Métodos físicos

1. *Hipotermia*: no hay datos que respalden el uso de la hipotermia como método único, y debe seguirse con un método secundario después de la pérdida de conciencia. Dado que las superficies frías pueden causar daños en los tejidos y presumiblemente dolor, los animales no deben entrar en contacto directo con hielo o superficies pre-enfriadas. Se considera un método condicionalmente aceptable en neonatos altriciales (< a 5 días) o fetos, pero es un método inaceptable para animales de más de 5 días (European Commission 1997; AVMA Guidelines 2020).
2. *Descompresión*: excluyendo el aturdimiento a baja presión atmosférica cuando se puede demostrar que logra la eutanasia, es un método inaceptable para la eutanasia debido a las múltiples desventajas que posee. 1) Muchas cámaras están diseñadas para producir descompresión a un ritmo de 15 a 60 veces más rápido que el óptimo recomendado para animales, lo que genera dolor y angustia atribuible a la expansión de los gases atrapados en las cavidades corporales; 2) Los animales inmaduros toleran la hipoxia y se

requieren períodos más largos de descompresión antes de que cese la respiración; 3) Puede ocurrir una recompresión accidental, con la recuperación de animales heridos; 4) Sangrado, vómito, convulsiones, micción y defecación, que son estéticamente desagradables, pueden desarrollarse en animales inconscientes (European Commission 1997; AVMA Guidelines 2020).

3. *Ahogamiento*: no es un método de eutanasia y es inhumano (European Commission 1997; AVMA Guidelines 2020).
4. *Asfixia*: impedir físicamente la respiración (asfixia, estrangulación, deshidratación) es inaceptable. Estos pueden incluir sacar un pez del agua y dejar que muera por hipoxia secundaria a la desecación del tejido branquial; dejar peces en un recipiente con agua sin la adecuada aireación, causándoles la muerte por anoxia (European Commission 1997; AVMA Guidelines 2020).
5. *Congelamiento rápido*: la congelación rápida como único medio de eutanasia no se considera humanitaria, con la excepción de reptiles pequeños (< 4 g), anfibios y roedores recién nacidos de < 5 días de edad, en los que se produce la muerte inmediata. En todos los demás casos, los animales deben morir o quedar inconscientes antes de congelarlos (European Commission 1997; AVMA Guidelines 2020).

Métodos químicos

Existen varios compuestos que son inaceptables en la eutanasia de animales debido al sufrimiento les que provocan, asociado con su uso o riesgo para el personal. Estos agentes incluyen estricnina, nicotina, cafeína, sulfato de magnesio, cloruro de potasio, agentes de limpieza, solventes, desinfectantes y otras toxinas o sales, y todos los agentes bloqueantes neuromusculares (Gagea-Iurascu, 2012).

1. *Bloqueantes neuromusculares* (nicotina, sulfato de magnesio, cloruro de potasio, todos los agentes curarizantes). Los bloqueantes neuromusculares son inaceptables como único medio de eutanasia, provocan un paro respiratorio antes de perder el conocimiento. Los animales bajo su influencia permanecen despiertos y pueden sentir dolor, angustia y estrés; si se utilizan estos agentes, deben actuar siempre después de que el anestésico haya producido su efecto evitando el sufrimiento del animal (European Commission 1997; AVMA Guidelines 2020).
2. *Cloroformo y éter*: el cloroformo es hepatotóxico, ambos son muy irritantes en las mucosas provocando angustia y dolor en los animales. Además, son extremadamente peligrosos para el personal (European Commission 1997; Carbone 2014; AVMA Guidelines 2020).
3. *Hidrato de cloral*: no es un agente de eutanasia aceptable porque los efectos adversos asociados pueden ser graves, las reacciones pueden ser

estéticamente objetables y otros productos son mejores opciones (AVMA Guidelines, 2020).

4. *Nitrógeno (N₂) y Argon (Ar)*: son gases inertes, incoloros e inodoros que no poseen propiedades inflamables o explosivas. El uso de estos gases es inaceptable en roedores. Estos gases crean un ambiente anóxico que es angustiante para algunas especies y aversivo para los roedores de laboratorio; otros métodos de eutanasia son preferibles para estas especies (AVMA Guidelines, 2020). Se ha observado que las ratas expuestas a Ar y N₂ exhibieron espasmos musculares y presentaron reflejos exacerbados al tacto y al manejo cuando parecían inconscientes. La taquicardia prolongada después de una exposición a corto plazo también se asocia con Ar. De manera similar el N₂ utilizado aproximadamente al 100 % no fue muy efectivo, ya que tardó en producir pérdida del conocimiento y muerte y también indujo reflejos exacerbados durante la exposición a corto plazo (Valentim, 2016). El uso de estos gases es un claro ejemplo de que las extrapolaciones entre especies exigen cierta precaución. Por ejemplo, a pesar de la variedad de aversiones de los mamíferos a la hipoxia inducida por nitrógeno, las aves de corral no parecen angustiarse en absoluto por el uso de estos agentes. Por lo tanto, el nitrógeno y el argón se enumeran como inaceptables para roedores; condicionalmente aceptables para cerdos y aceptables para aves de corral. De cualquier manera, se deben considerar las implicaciones de bienestar de los animales al uso de gases inertes para eutanasia en cuanto

a la asfixia, que puede causar hemorragia alveolar, y el desplazamiento de oxígeno que induce hipoxia antes de la pérdida de conciencia. (Carbone 2014; Valentim 2016).

Necropsia

La necropsia se define como un estudio sistemático *post mortem* de un cadáver animal, consiste en la observación de cambios macroscópicos de tejidos y órganos *in situ* a simple vista y la recolección de muestras de órganos y tejidos claves para el análisis posterior (Fiette, 2011). Los procedimientos *post mortem* incluyen la necropsia, la recolección de muestras de tejido, y el registro de las lesiones observadas. Los principales usos de estos procedimientos son el diagnóstico, el control de calidad de la salud, estudios de toxicología y resultados de experimentos (Feinstein 2003; Briceño 2018). En los animales de laboratorio la necropsia representa una valiosa herramienta para la obtención de datos como causa de muerte, el grado de enfermedad o lesión, el efecto de la terapia o la identificación de alguna condición patológica no detectada *ante mortem* (Fiette 2011; Gagea-Iurascu 2012; Briceño 2018)

El proceso de necropsia junto con la recolección y envío de muestras apropiadas para la realización de pruebas de laboratorio es trascendental en el proceso de emisión de un diagnóstico. Las técnicas del muestreo pueden influir considerablemente en los resultados de un experimento. Los protocolos para la eutanasia y necropsia de los animales, la

recolección de tejidos, el tiempo requerido para realizar el procedimiento *post mortem*, el tipo de fijadores y los tiempos de fijación son algunos de los temas que deben ser considerados minuciosamente en el diseño de experimentos con animales. El proceso de toma de muestras durante las necropsias debe estar determinado por la naturaleza de la muestra y los objetivos que persigue el investigador para tener un valor diagnóstico, debe seguir un procedimiento previamente determinado y cualquier desvío de él debe ser documentado (Feinstein 2003; Fiette 2011; Briceño 2018). Dado que existe una sola oportunidad de realizar una necropsia, el que sea bien hecha y documentada permite detectar, describir e informar cualquier hallazgo importante que pueda ser clave para comprender los cambios observados durante la parte *in vivo* del experimento. Por lo tanto, es importante que el personal a cargo de esta tenga acceso a la historia del animal, incluido el examen clínico y los cambios de comportamiento que precedieron a la necropsia, así como a los resultados de cualquier estudio de imagen o de laboratorio (Fiette 2011; Gagea-Iurascu 2012).

Recomendaciones generales

Durante la necropsia, se recomienda colocar los instrumentos en un contenedor, en lo posible, de acero inoxidable con etanol al 70 %. Los materiales cortopunzantes usados deben colocarse en un recipiente especial para ellos y bien identificados.

Hay varios peligros/riesgos relacionados con la manipulación y disección de animales de laboratorio durante la necropsia que deben tenerse en cuenta. Por ejemplo, el riesgo químico: la formalina (utilizada para fijar tejidos) causa irritación en los ojos, la piel, la nariz y las vías respiratorias; también está clasificado como un fuerte sensibilizador de la piel y carcinógeno en humanos. Por lo tanto, la formalina no debe manipularse sin guantes o fuera de una campana extractora. También existe el riesgo biológico, los roedores de laboratorio pueden ser transmisores de zoonosis, alergias. Trabajar con animales de laboratorio puede conducir a la exposición a alérgenos por inhalación, contacto directo de la piel y los ojos con caspa, cabello, orina, suero o saliva de animales. Debido a estos riesgos el personal que realiza la necropsia debe utilizar equipo protector y los restos de cadáveres se deben eliminar apropiadamente (Fiette 2011; Gagea-Iurascu 2012).

No existe un mejor método único de necropsia que se adapte a todas las circunstancias y deseos del patólogo o investigador que realiza la necropsia. Cualquier técnica de necropsia es adecuada siempre que se realice un examen completo de todos los órganos, todos los hallazgos macroscópicos se registren correctamente, se recolecten muestras de tejido apropiadas y se aborden los objetivos del experimento y las investigaciones diagnósticas. Siempre es importante haber leído previamente con cuidado el plan del experimento que se llevó a cabo o el protocolo de la necropsia correspondiente.

Protocolo general de necropsia

A continuación, se da un ejemplo de un posible protocolo para realizar una necropsia. Los pasos principales a seguir son los siguientes:

- *Examinar el animal vivo (siempre que sea posible):* pesarlo y observar su comportamiento y reacción frente a estímulos externos, observar la piel y el pelo. Observar ojos, boca, fosas nasales y región anogenital. Registrar cualquier cambio o lesión que se encuentre. Por último palpar con cuidado la cavidad abdominal buscando la presencia de tumoraciones o líquido acumulado. Si existe líquido abdominal tomar una muestra con jeringa estéril, de existir algún bulto palparlo y registrar tamaño aproximado y consistencia.
- Realizar la eutanasia con el método adecuado.
- *Exanguinación:* puede realizarse cuando el animal está en con anestesia profunda o enseguida de la eutanasia. Generalmente se realiza mediante punción cardíaca de forma de obtener el mayor volumen de sangre para realizar los posteriores análisis (Fig. 49).
- *Abrir la cavidad abdominal:* colocar el animal decúbito dorsal, desinfectar la piel con alcohol 70 %. Hacer una incisión en la piel en la línea media, desde las mandíbulas hasta el pubis. Separar la piel hacia los costados. Observar la piel y tejido subcutáneo registrando cualquier cambio o lesión observada. Examinar las

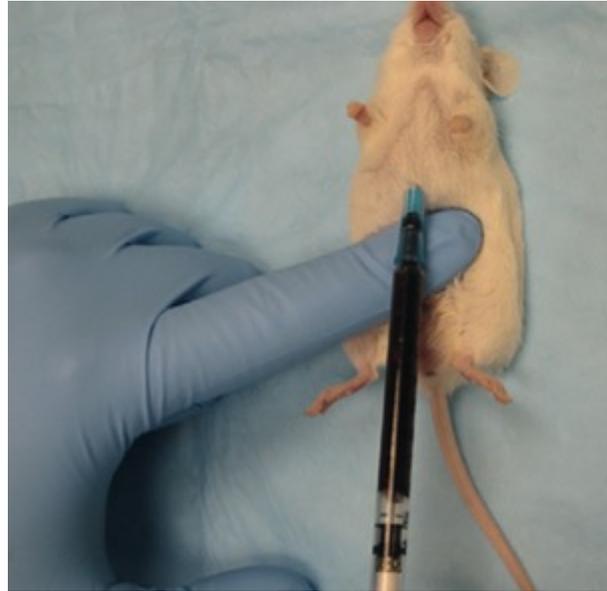


Fig. 49: Muestra de sangre por punción cardíaca (adaptado de Gagea-Iurascu, 2012)

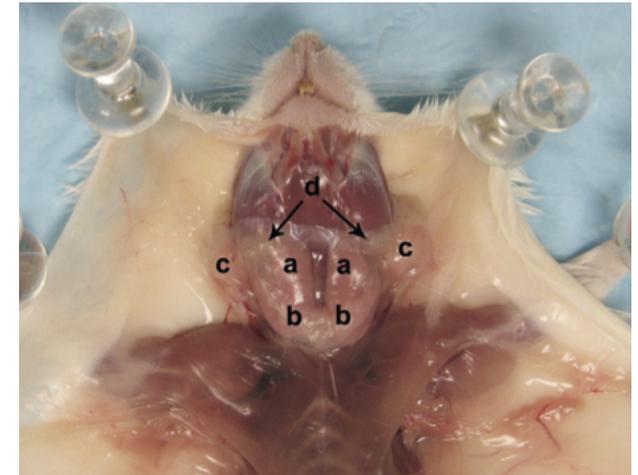


Fig. 50: Glándulas salivales: a) sublingual, b) submandibular, c) parótidas, d) submandibular (adaptado de Gagea-Iurascu, 2012).

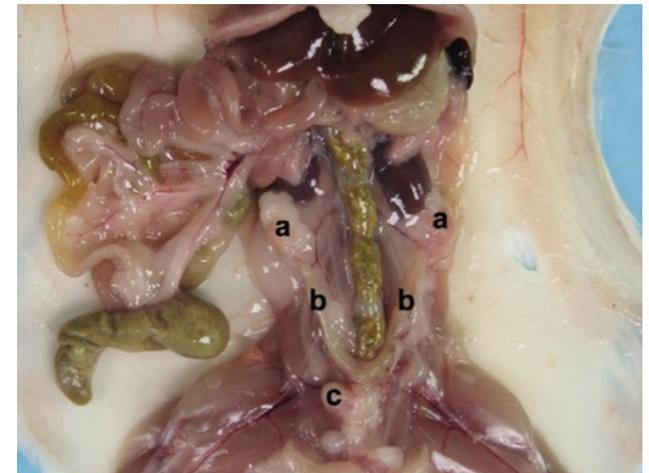
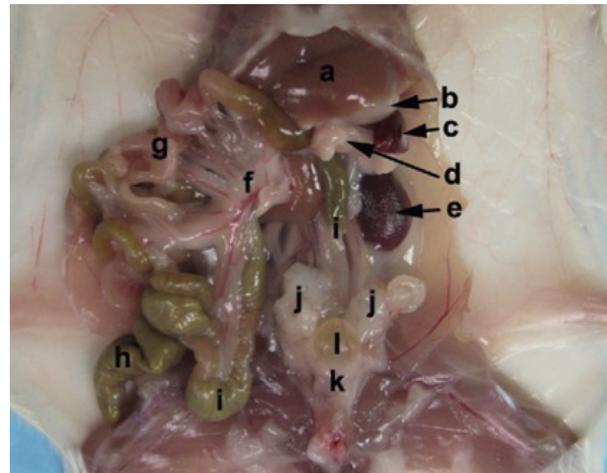


Fig. 51: Órganos abdominales: Macho (izquierda) : a) hígado, b) estómago, c) bazo, d) páncreas, e) riñón, f) mesenterio, g) intestino delgado, h) ciego, i) colon, j) vesículas seminales, k) próstata, l) vejiga urinaria. Hembra (derecha: a) ovarios, b) cuernos trinos, c) vejiga urinaria (adaptado de Gagea-Iurascu, 2012)

glándulas mamarias. Examinar los tres pares de glándulas salivales ubicadas a ambos lados de la región craneoventral del cuello: glándulas mandibulares, sublinguales y parótidas (Fig. 50). Una vez concluido esto, proceder a abrir la pared abdominal, teniendo especial cuidado de no cortar ningún órgano y examinar todos los órganos observando su posición registrando cualquier lesión y tomando muestras. Observar la cantidad de grasa abdominal. Comenzar observando el bazo, pesarlo y fijarlo entero o pequeñas muestras. Seguir por el tracto digestivo, extraer el intestino separado del páncreas, continuar por el estómago. A continuación, observar el hígado, es un órgano muy frágil y se debe manipular con mucho cuidado, pesarlo y tomar las muestras necesarias. Retirar los riñones y glándulas adrenales observando forma, color, volumen y presencia o no de nódulos. Pesar los riñones sin las glándulas adrenales y tomar las muestras necesarias. Seguir por la vejiga urinaria y luego por el sistema reproductor. En el caso de machos observar testículos, retirarlos y pesarlos, en las hembras observar útero y ovarios, forma, color y presencia o no de alguna lesión retirarlos y pesarlos. Fijar muestras de todos los órganos al momento de tomarlas (Figs. 51 y 52).

- *Abrir la cavidad torácica:* abrir el tórax levantando primero el xifoides esternal con pinzas. Luego cortar las costillas comenzando desde el xifoides y hasta la primera costilla para quitar el esternón y la caja torácica y así poder observar los órganos. Al igual que para la cavidad

torácica, observar posición de los diferentes órganos (lengua, laringe, tráquea y esófago, pulmones y corazón) registrar cualquier anomalía, retirar cada órgano, pesar y tomar muestras para histopatología (Fig. 53).

- *Abrir el cráneo:* retirar la piel sobre la cabeza con una incisión longitudinal mediana desde la nuca hasta el hocico, observar los ojos y las glándulas harderianas (Fig. 54). Manteniendo la cabeza firmemente con unas pinzas grandes, cortar el hueso nasal transversalmente al nivel del tabique nasal entre las dos cavidades orbitales. Cortar progresivamente los huesos parietal, interparietal y occipital en dirección craneocaudal en ambos lados de forma de poder tener el cerebro a la vista (cuidadosamente para no dañar el cerebro) (Fig. 55a). Retirar el cerebro con cuidado es un tejido muy frágil, una vez hecho esto con la cavidad craneana vacía se puede observar la hipófisis y los nervios ópticos (Fig. 55b).
- *Examinar músculos y esqueleto:* retirar la piel de los miembros posteriores o pelvianos. En ratones, ratas, cobayos, hámsteres y otros roedores, suelen fijarse los miembros anteriores (o torácicos) y posteriores (o pelvianos) (Fig. 56) para evaluar el músculo esquelético, las articulaciones, la médula ósea y el tejido óseo.

Los animales encontrados muertos pueden colocarse en un refrigerador (pero *no* congelarse). Las necropsias deben realizarse tan pronto como sea posible (si

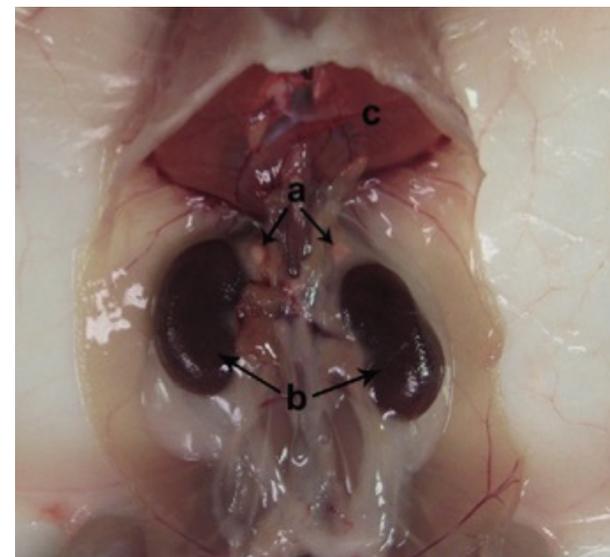


Fig. 52: Órganos abdominales: a) glándulas adrenales, b) riñones, c) diafragma (adaptado de Gagea-Iurascu, 2012)

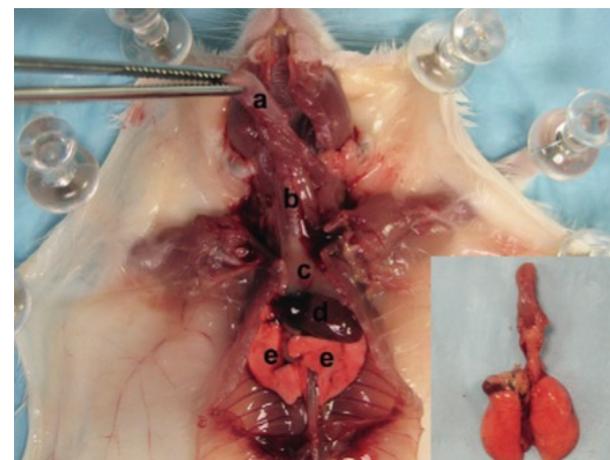


Fig. 53: Cavidad torácica: a) lengua, b) tráquea, c) timo, d) corazón, e) pulmones. En ángulo inferior derecho se observan pulmones (adaptado de Gagea-Iurascu, 2012)

es posible el mismo día) (Feinstein 2003; Fiette 2011; Gagea-Iurascu 2012).

En capítulos anteriores hemos comentado los procedimientos adecuados para obtener diferentes tipos de muestras. A continuación, detallaremos algunas consideraciones en cuanto a la obtención de diferentes tejidos animales a partir de eutanasia o de biopsias.

Una vez manipulados, los tejidos comienzan a sufrir autólisis, proceso por el cual se produce la autodigestión enzimática celular tras la salida del contenido de los lisosomas al citoplasma celular. Este proceso natural se acelera en caso de aumento de temperatura ambiente, ya que tiene su rango óptimo entre los 37 y 42°.

Para detener el proceso de autólisis los tejidos se fijan, tratando de conservar las muestras lo más parecido que sea posible a cuando estaban en el animal vivo y sin manipulación. Con el proceso de fijación se busca alcanzar una imagen equivalente entre tejidos idénticos obtenidos de distintos individuos de una misma especie animal. De esto depende la reproducibilidad de las preparaciones posteriores y la obtención de datos fiables y repetibles.

Los tejidos pequeños se pueden guardar en casetes de histología en el momento de la disección. El mismo casete, debidamente identificado, se puede utilizar para la inclusión en parafina y la preparación de bloques de parafina.



Fig. 54: Ojos y glándulas harderianas (flecha) (adaptado de http://eulep.pdn.cam.ac.uk/Necropsy_of_the_Mouse/printable.php)



Fig. 55b: Hipófisis (flecha) y nervios ópticos (adaptado de http://eulep.pdn.cam.ac.uk/Necropsy_of_the_Mouse/printable.php)



Fig. 55a: Forma de abrir la cavidad craneana para retirar cerebro (adaptado de http://eulep.pdn.cam.ac.uk/Necropsy_of_the_Mouse/printable.php)

En cada paso se debe observar con atención la región que se abrió, registrar claramente todo lo que se observa y tomar las muestras necesarias. La descripción de los hallazgos macroscópicos debe ser lo suficientemente detallada para dar una representación mental de los cambios macroscópicos observados. Por lo tanto, todos los criterios deben usarse para describir los cambios macroscópicos de un órgano: ubicación, apariencia (color, forma, consistencia), demarcación de los tejidos circundantes, número, distribución y gravedad, tamaño, que siempre debe medirse en dos o tres dimensiones (cm o mm), o en volumen (ml). Un dato que puede aportar información es el tamaño y peso de los órganos, se pueden comparar como pesos absolutos de los órganos o como proporciones del peso de los órganos al peso corporal total o al peso del cerebro. En todos los casos, los órganos deben pesarse libres de grasa circundante y tejidos conectivos. Es importante eliminar estos tejidos de manera estandarizada y sin inducir ningún daño o artefacto en el tejido (Fiette, 2011). Los artefactos tisulares causados por la manipulación, disección y examen durante la necropsia y por la fijación, recorte y procesamiento de tejidos en secciones histológicas deben ser mínimos o inexistentes. La manipulación cuidadosa de los tejidos durante la disección, el examen y la toma de muestras evitará la distorsión de la arquitectura tisular (Gagea-Iurascu, 2012). En lo posible cuando se toma una muestra de tejido con alguna lesión en particular se debe agregar una porción de tejido sano para poder compararlos.

Es importante también para obtener las muestras en buenas condiciones la cantidad de fijador a utilizar,

esta debe ser 10 a 20 veces más que el volumen de la muestra a fijar.

No existe un fijador universal y perfecto para todos los tejidos. Por otra parte, no todos los fijadores conservan de forma indefinida las muestras. Finalmente, una vez ocurrida la fijación, no se podrá mejorar el resultado en manipulaciones posteriores; por lo tanto, una mala fijación es incorregible.

Los fijadores se pueden clasificar según su mecanismo de actuación en: fijadores por método físico y químico.

En los mecanismos físicos se conserva intacta la estructura antigénica y el contenido enzimático. Se utiliza principalmente como método físico, el enfriamiento de las piezas. Es imprescindible que el proceso de fijación sea casi instantáneo, ya que se evita la formación de microcristales que sufrirán agregación y, con el paso del tiempo, van a dañar la muestra. Se estima que un rango aceptable es llevar a la muestra al menos a -50 grados en menos de 10 segundos, con muestras que no superen los 3 mm de espesor. Es común utilizar nitrógeno líquido o sus vapores para fijar y almacenar en freezer de -80 grados (Fig. 57).

Los métodos químicos involucran la utilización de soluciones fijadoras. Estas soluciones deben bloquear lo antes posible la autólisis, desnaturalizando proteínas y deteniendo la actividad enzimática. Cuando utilizamos este tipo de fijación evitamos en buena medida provocar retracciones o cambios de textura, aunque esto no siempre es posible.

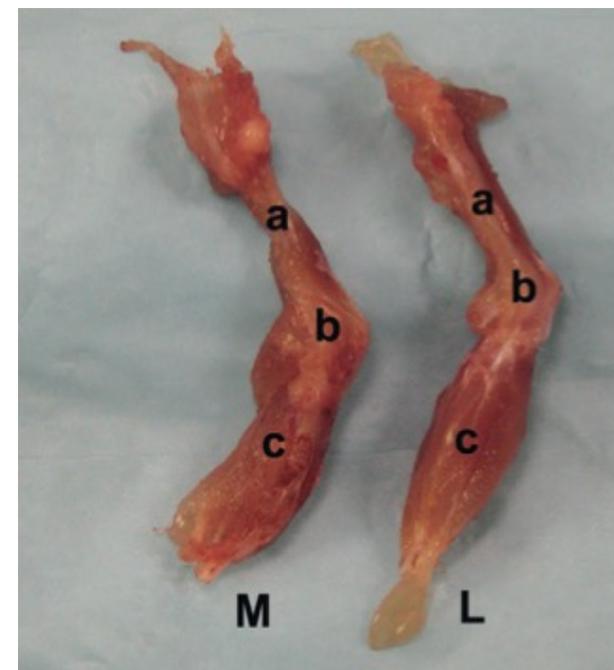


Fig. 56: Extremidades traseras: a) fémur, b) rodilla, c) tibia. A la izquierda en vista media y a la derecha en vista lateral (adaptado de Gagea-Iurascu, 2012)

Existe una serie de reglas generales a considerar en el empleo de líquidos fijadores:

- a. Sumergir lo más pronto posible la muestra en el fijador
- b. El tejido no debe superar 1 cm de espesor en su porción más gruesa.
- c. La relación entre el volumen del fijador y de la muestra siempre tiene que ser superior a 20 partes de fijador por cada parte de muestra.
- d. Debe tratarse de mantener de forma equivalente la presión osmótica entre el tejido y la solución fijadora, esto implica en la mayoría de los casos utilizar soluciones tamponadas.
- e. El tiempo mínimo requerido para que la fijación ocurra es específico de cada solución. Existen rangos mínimos y máximos entre los que se debe trabajar para no alterar las muestras.

Los fijadores químicos son una gran familia de sustancias dentro de la que se puede distinguir los simples que son aquellas soluciones que se diluyen para ser utilizadas, por ejemplo, formaldehído; o los compuestos que son soluciones que contienen más de una sustancia en proporción adecuada, también con un pH óptimo, por ejemplo, solución de Bouin. Es importante tener en cuenta que para cada tipo de tejido existe un fijador o algunos fijadores más eficientes, así como tiempos de exposición específicos.



Fig. 57: A y B: se observa por fuera y por dentro un freezer de -80° . C: se observa un termo utilizado tanto para almacenar nitrógeno líquido como para almacenar muestras cuando fijamos por método físico (foto Dra. Patricia Genovese)

En general, se preparan en soluciones buffer para acercarse a un pH neutro.

Al obtener una muestra de un órgano se debe procurar una correcta manipulación, utilizando pinzas sin apretar las muestras y manipulándolas desde los bordes o regiones que se puedan descartar posteriormente (Fig. 58 b). Por otro lado, es importante respetar el espesor de las muestras, los volúmenes de los fijadores y siempre va a ser conveniente tener recipientes que permitan identificar cada una de las muestras. En este sentido, los recipientes van desde los frascos para muestras biológicas a lo ideal para el procesamiento histológico completo, los casetes (Fig. 58). Estas son cajas de plástico con ranuras que permiten identificar cada muestra, pero trabajar con gran cantidad de muestras juntas en el procesamiento posterior.

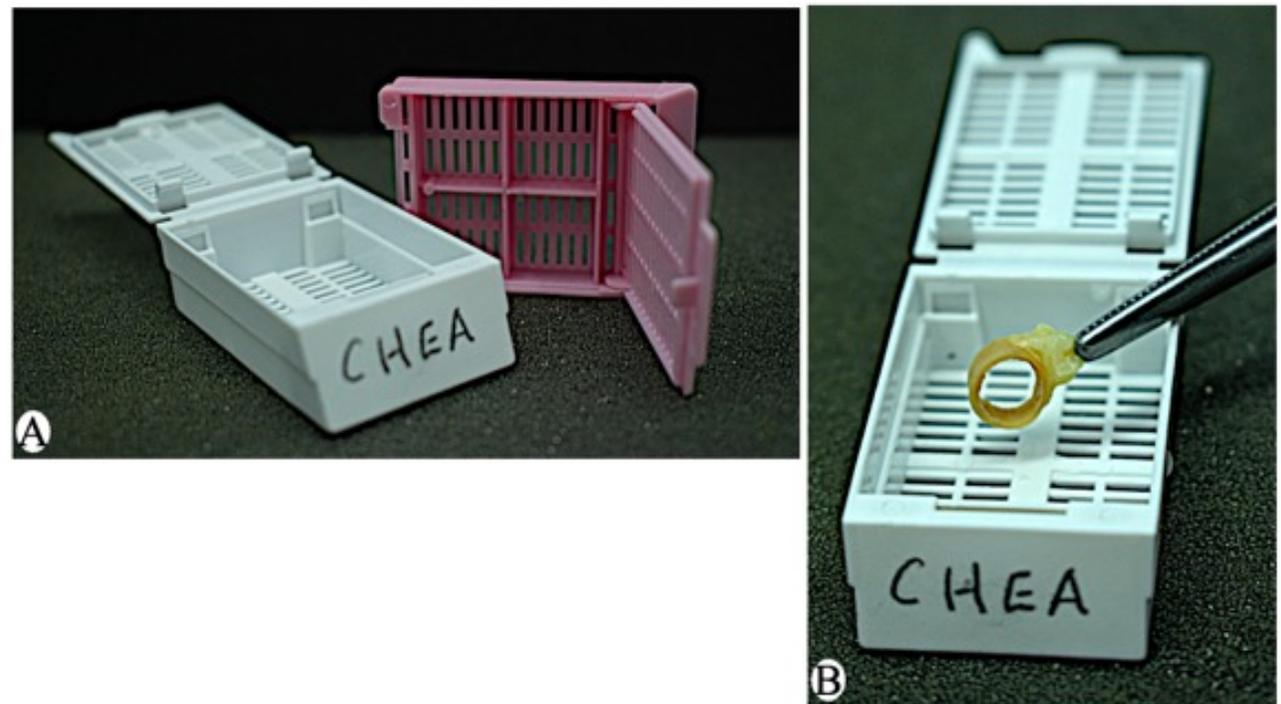


Fig. 58: A: se observa distintos modelos de cassettes para almacenar e identificar las muestras de tejidos que se sumergirán en fijadores químicos. B: se observa la forma correcta de manipular las muestras por los bordes. Observe que se trata de una muestra de intestino. El operador la toma con la pinza a nivel de la grasa del mesenterio, evitando dañar la muestra de intestino (foto Dra. Patricia Genovese)

Bibliografía

- Álvarez Gómez I (2008): Métodos de anestesia, analgesia y eutanasia. En: Ciencia y tecnología del animal de laboratorio, Cap. 14
- American Veterinary Medical Association (2020): Guidelines for the euthanasia of animals 121 pp ISBN: 978-1-882691-09-8. <http://www.avma.org>
- Balls M (1999): The biomedical sciences and the need for less inhumane animal procedures. In: Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research (Hendriksen CFM, Morton DB, Eds)
- Briceño A, Molina M, Brito Y, Moreno Y Méndez O, Álvarez A, Esteves C y Moya M (2018): Técnicas de Necropsia y toma de muestras en animales de experimentación: Una revisión bibliográfica y actualización. Revista del Instituto Nacional de Higiene «Rafael Rangel» 49 (2): 52-63
- Canadian Council on Animal Care (2010): Guidelines on: euthanasia of animals used in science. 36 pp ISBN: 978-0-919087-52-1. <http://www.ccac.ca>
- Carbone L (2014): Euthanasia and Laboratory Animal Welfare. Laboratory Animal Welfare Cap 11. Elsevier. [Chttp://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-385103-1.00011-7](http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-385103-1.00011-7)
- European Commission (1997): Euthanasia of experimental animals 104 pp ISBN 92-827-9694-9
- Feinstein R; Waggle K (2003): Postmortem Procedures. In: Handbook of Laboratory Animal Science Vol I Essential Principles and Practices Cap 21. Ed Jhau and G Van Hoosier. ISBN 0-8493-1086-5
- Fiette, L., Slaoui, M. (2011). Necropsy and Sampling Procedures in Rodents. In: Gautier, JC. (eds) Drug Safety Evaluation. Methods in Molecular Biology, vol 691. Humana Press. ISBN 978-1-60327-186-8 DOI 10.1007/978-1-60761-849-2_3
- Gagea-Iurascu M, Craig S (2012): Euthanasia and necropsy. In: The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents Cap 4. Editor(s): Mark A. Suckow, Karla A. Stevens, Ronald P. Wilson. American College of Laboratory Animal Medicine ISBN 9780123809209 DOI: 10.1016/B978-0-12-380920-9.00004-3
- Guide for The Care and Use of Laboratory Animals, Eighth Edition (2011). The National Academies Press 246 pp.
- Hedenqvist P; Hellebrekers L (2003): Laboratory Animal Analgesia, Anesthesia, and Euthanasia. In: Handbook of Laboratory Animal Science Vol I Essential Principles and Practices Cap 17. Ed Jhau and G Van Hoosier. ISBN 0-8493-1086-5
- Hendriksen FM; Morton, D B (1999): Humane endpoints in animal experiments for biomedical research. In: International Conference on Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research (1998: Zeist, Netherlands). Royal Society of Medicine Press.
- Laferriere C., Pang D (2020): Review of intraperitoneal injection of sodium pentobarbital as a method of euthanasia in laboratory rodents. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science 59 (3): 254-253.
- Morton D B (2005): Humane endpoints in animal experimentation for biomedical research: ethical, legal and practical aspects Laboratory Animals (2005) 8, 5-12
- Mellor, D.J., 2010. Galloping colts, fetal feelings, and reassuring regulations: putting animal-welfare science into practice. Journal of Veterinary Medical Education 37 (1), 94-100.

Valentim A, Guedes R, Pereira A, Antunes L (2016): Euthanasia using gaseous agents in laboratory rodents. *Laboratory Animals* 50 (4): 241-253. Doi: 10.1177/0023677215618618

Sitios web

<https://www.humane-endpoints.info/es>

http://eulep.pdn.cam.ac.uk/Necropsy_of_the_Mouse/printable.php

Capítulo IX.

Más allá de las 3R's... Reflexiones en torno a la ética en experimentación animal y las emociones en los animales de laboratorio

NATALIA URIARTE^{1,2}, ANNABEL FERREIRA³, DANIELLA AGRATI³

¹Laboratorio de Neurociencias, ²Comisión de Ética en el Uso de Animales; ³Sección Fisiología y Nutrición, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Introducción

Los experimentos con animales han posibilitado un gran avance en diversas áreas del conocimiento científico. Este avance ha sido particularmente vertiginoso en el área biomédica, donde se ha obtenido un gran cuerpo de resultados extrapolables al hombre. Los animales de laboratorio se utilizan como modelos para el estudio de mecanismos básicos, efecto de drogas y enfermedades físicas y psiquiátricas propias de nuestra especie, así como para entender su propia fisiología y comportamiento y los mecanismos biológicos que los subyacen. Junto con el crecimiento del conocimiento científico generado a través del uso de animales, han ido aumentando los cuestionamientos a la experimentación animal, tanto por los profesionales directamente implicados como por la sociedad en general. Esta preocupación ha llevado a la formulación de normativas orientadas a incentivar el uso responsable de los animales en actividades

experimentales, incluyendo la investigación, la docencia y la producción (Ferreira, 2019).

Gran parte de las reglamentaciones actuales sobre el uso de animales de laboratorio, a nivel nacional e internacional, tiene sus principios guía en lo que en la actualidad conocemos como *las tres erres* (3R's): Reemplazo, Reducción y Refinamiento, inicialmente definidas por los investigadores británicos William Russell y Rex Burch en 1959 (Russell, 1959). El principio de reemplazo plantea que, siempre que sea posible, el uso de animales debe sustituirse por métodos alternativos. La reducción implica que el número de animales a utilizar en una investigación debe reducirse al mínimo posible sin comprometer la viabilidad de los experimentos ni la validez de los resultados. El refinamiento refiere al deber de los investigadores de utilizar los métodos y técnicas que minimicen el dolor, sufrimiento o angustia y promuevan el bienestar de los animales utilizados.

Hace más de 50 años que estas directrices son pilares del análisis de diversos aspectos vinculados a la experimentación animal, incluyendo su tratamiento en comisiones de ética y agencias financiadoras (Breijo, 2019). Sin embargo, en los últimos años se han sumado nuevos elementos a considerar en la discusión y actualización de estos principios. En particular, el avance científico en áreas de investigación como la neurociencia afectiva ha generado nuevos conocimientos sobre las capacidades cognitivas, emocionales y sociales de los animales de laboratorio que deben ser considerados en la reflexión y en la práctica científica. En este capítulo presentamos algunos de estos avances, así como su potencial relevancia en la discusión ética acerca de la experimentación animal.

Emociones en animales no humanos: aportes desde la neurociencia afectiva

La propuesta de que los animales no humanos experimentan emociones no es nueva. Desde hace milenios se sostiene que los animales son seres sintientes, es decir, tienen la capacidad de tener experiencias de placer y dolor, de juego y alegría o de sufrimiento.

Charles Darwin, en «La expresión de las emociones en el hombre y en los animales», ya en 1872 propuso que «los animales sienten placer, dolor, alegría y tristeza». Sin embargo, el estudio sistemático de las experiencias emocionales en otras especies, al igual que de sus bases neurobiológicas, se vio relegado hasta muy entrado el siglo XX.

Una de las corrientes científicas que ha hecho más hincapié en el estudio de las emociones en animales no humanos es la denominada *neurociencia afectiva*, fundada por el neurocientífico estonioamericano Jaak Panksepp. Desde esta corriente se ha prestado especial atención en mostrar que los animales tienen afectos, es decir, experiencias asociadas a sistemas emocionales básicos y a cambios neurofisiológicos específicos. Estos sistemas afectivos no serían un monopolio de nuestra especie, sino que se construyeron evolutivamente a partir de respuestas básicas, que han permitido la supervivencia, la reproducción y el bienestar en el mundo animal. Esta afirmación se sustenta en la homología entre las respuestas fisiológicas y conductuales de otros animales frente a determinados estímulos y contextos, así como de los circuitos neurales implicados en esas respuestas

emocionales y las de nuestra especie. Aunque los animales no humanos no analizan las emociones como lo hacemos nosotros, esta evidencia apoya que las experimentan de forma similar (Kringelbach, 2008; Panksepp, 2011).

Uno de los mayores desafíos vinculados al estudio de las emociones en animales no humanos es la dificultad para identificarlas y evaluarlas. Sin embargo, el estudio de sus respuestas comportamentales y fisiológicas frente a estímulos emocionalmente relevantes o competentes —como un potencial predador, un alimento palatable, o las crías para una madre— junto con la caracterización de los circuitos neurales que las subyacen, ha comenzado a revelar su mundo emocional. Por ejemplo, se ha postulado que las vocalizaciones que emiten las crías de aves y de mamíferos ante la separación de sus padres reflejan un estado emocional negativo relacionado con la angustia. Este estado sería regulado por un circuito neural que involucra áreas y sistemas de neurotransmisión implicados a su vez en trastornos psiquiátricos como la depresión en seres humanos (Panksepp, 2011). A partir de estos modelos se ha avanzado mucho en la comprensión de las bases neurobiológicas de estados emocionales con valencia negativa en animales no humanos.

A diferencia de las emociones negativas, los estados emocionales con valencia positiva, o placenteros, han sido menos estudiados en animales de laboratorio. Los trabajos pioneros de Kent Berridge de la Universidad de Michigan, muestran que tanto las ratas como los bebés tienen expresiones faciales con características similares en respuesta a sabores dulces

y amargos, que serían indicadores de placer o placer sensorial (Berridge, 2000).

Por otro lado, las investigaciones de Panksepp y su grupo, explorando la emisión de vocalizaciones ultrasónicas en la rata como expresión de afectos positivos y negativos en contextos sociales, permitieron avanzar de forma sustancial en la comprensión del espectro emocional de esta especie. En particular, observaron que, durante las interacciones de juego entre pares, los animales emitían vocalizaciones ultrasónicas características de 50 kHz. También las cosquillas realizadas por el investigador despertaban en las ratas, las mismas vocalizaciones relacionadas con el juego y a las interacciones sociales entre congéneres (Burgdorf, 2006). Estos autores sostienen que la risa en humanos y la emisión de vocalizaciones ultrasónicas de 50 kHz en la rata son homólogas, ya que ambas se expresan en contextos emocionales similares y comparten mecanismos y áreas neurales entre ambas especies.

Un número creciente de estudios en roedores de laboratorio sostiene que estos animales realizan comportamientos prosociales y empáticos, tendientes a aliviar el distrés o la angustia de un congénere. Por ejemplo, Ben-Ami Bartal y su grupo de investigación de la Universidad de Chicago, colocaron a una rata libre en una superficie abierta que contenía una caja transparente cuyas dimensiones restringían el movimiento donde otra rata estaba encerrada. En poco tiempo, la primera rata aprendió a abrir la puerta de la caja para liberar a su compañera. Cuando liberar a la compañera se contraponía con abrir otra caja

para obtener chocolate, la mayoría de las ratas liberaban a la rata atrapada y compartían su chocolate con ella. Los autores del experimento proponen que las ratas se comportan de manera prosocial en respuesta a la angustia o el estrés de un congénere (revisión de Decety, 2016).

Las ratas no solo se «ríen» y muestran comportamientos prosociales y empáticos frente a sus congéneres, sino que también juegan solo por el hecho de jugar. Tal vez para quien trabaja en un laboratorio de experimentación animal esto no suene en particular novedoso, ya que es habitual observar interacciones de juego en los animales alojados en grupos, principalmente en individuos juveniles. Pero notablemente, las ratas también aprenden juegos que requieren capacidades cognitivas complejas, como la representación mental del juego y sus reglas. En los experimentos desarrollados por el grupo de Michael Brecht (Reinhold, 2019) se enseñó a las ratas a jugar a las escondidas con un ser humano, ya fuera buscándolo cuando este se escondía o escondiéndose mientras la persona las buscaba. Las ratas aprendieron la estrategia del juego, es decir, primero visitaban lugares donde se había escondido antes la persona, mientras que cuando se escondían, elegían cajas opacas o de cartón en lugar de cajas transparentes. Además, cuando buscaban a la persona escondida se comportaban de manera diferente y emitían más vocalizaciones de 50 kHz en relación con cuando se escondían. Una de las conclusiones de esta interesante investigación fue que para las ratas buscar o esconderse no cumple otra función más que la del placer por jugar.

¿Qué implicancias acarrea para la discusión ética de la experimentación animal reconocer que los animales de laboratorio experimentan emociones?

Al postular que otras especies, al igual que la nuestra, tienen experiencias emocionales que se sustentan en sustratos neurobiológicos conservados evolutivamente que pueden y se deben estudiar científicamente, Jaak Panksepp no solo colocó la piedra fundamental de la Neurociencia Afectiva como disciplina de estudio, sino que aportó nuevos elementos a la discusión del dilema ético que conlleva la experimentación animal. Reconocer que los animales de laboratorio tienen experiencias emocionales, muchas probablemente muy similares a las nuestras, nos interpela como investigadores. ¿Qué consecuencias tiene este conocimiento sobre el estatus moral que otorgamos a los animales de laboratorio? ¿Cómo incorporamos estos conceptos al trabajo de experimentación en el laboratorio? Las respuestas a estas preguntas involucran profundas reflexiones teóricas y filosóficas, y al mismo tiempo subrayan sus efectos prácticos para promover el bienestar animal durante nuestras investigaciones.

El conocimiento generado sobre las capacidades afectivas de los animales de laboratorio constituye un insumo importante para las voces que abogan por eliminar la experimentación con roedores, de la misma forma en que fueron la base para reducir la experimentación con primates. Diversas organizaciones y académicos plantean que nuestra «miopía

moral» e «implacable antropocentrismo» nos impiden tenerlos en cuenta de la misma forma en que lo hicimos con los primates (Andrews, 2020). Así, de forma paradójica, la homología de las bases neurales de las experiencias emocionales y sociales entre los roedores de laboratorio y los seres humanos ha llevado a fortalecer su uso como modelos para el estudio de procesos psicopatológicos propios de nuestra especie. Siguiendo esta línea de pensamiento, si bien Panksepp plantea que tratar a otros animales como si no experimentaran emociones es un error ético y, por tanto, un dilema que los investigadores deben considerar con franqueza, al mismo tiempo sostiene que «el conocimiento científico sobre nuestra herencia afectiva compartida puede justificar los sacrificios que se requieren» (Panksepp, 2011).

De acuerdo con estas reflexiones y posiciones, creemos que es fundamental que los científicos que trabajamos utilizando animales en nuestra investigación, reflexionemos y discutamos en torno a este dilema, planteándonos sería y honestamente cómo debemos relacionarnos con los animales experimentales. En este sentido, Cardoso y Almeida (2014) hacen una interesante reflexión sobre qué implicancias puede tener la forma en cómo nos referimos a los animales de laboratorio. Estos autores plantean su preocupación al notar que, a pesar de que reconocemos que estos animales experimentan emociones, muchos textos académicos, convocatorias financiadas, manuales de procedimientos y otros instrumentos institucionales, especialmente en ciencia, tecnología y actividades de innovación, utilizan términos como *producto*, *reactivo biológico*, *insumo*,

material, para referirse a ellos. Estas expresiones, que eluden una franca denominación que haga patente la condición de seres sintientes de los animales, contribuyen a instrumentalizar su empleo y a enmascarar el dilema moral que esta práctica conlleva. Esto, a su vez, podría acarrear la postergación de la búsqueda de alternativas y mejoras en los procedimientos experimentales y la concientización de que no se tratan de meros medios biológicos (células, tejidos, órganos, modelos, etc.) para la producción e investigación, sino de seres sintientes, con sus propias necesidades y capacidades.

A su vez, desde la práctica científica, el conocimiento que arroja el estudio de las emociones y de las formas en las cuales los animales las manifiestan puede redundar en un mayor bienestar animal. Un ejemplo de esto surge del estudio del dolor en roedores de laboratorio. Esta área de estudio se ha impulsado desde dos perspectivas: el punto de vista científico y el del bienestar (Mota-Rojas, 2020). Mientras que desde el punto de vista científico se le otorga un valor extrínseco al animal, vinculado a la solidez y robustez de los resultados obtenidos a partir de su uso, desde el punto de vista del bienestar se considera el valor intrínseco del animal. Esto implica que el dolor que se produce con frecuencia en la experimentación debe evitarse o minimizarse en beneficio del animal. A pesar de las diferencias entre estos puntos de vista, en cuanto a su motivación subyacente ambos comparten la necesidad de contar con un método fiable y práctico para evaluar el dolor. Con este fin se desarrollaron las Escalas Grimace, que permiten evaluar el dolor que experimentan los roedores a

partir de sus expresiones faciales (Langford, 2010). Esta posibilidad de detectar y cuantificar el dolor de forma fiable y precisa, en tiempo real, ofrece una herramienta muy importante para diagnosticar y evitar el dolor, el miedo y el estrés o angustia durante la ejecución de los protocolos experimentales.

Por otra parte, diversos autores proponen que el bienestar animal no radica simplemente en reducir las emociones negativas, sino que también debería incluir, y quizás de forma predominante, la presencia de emociones positivas. En otras palabras, además de la necesidad de evitar el sufrimiento, debemos asegurar las condiciones para que se expresen comportamientos emocionalmente positivos (Boissy, 2007). En este sentido, existen iniciativas que buscan desarrollar los primeros indicadores faciales de emociones positivas en ratas luego de sesiones de cosquillas con los investigadores para explorar los estados emocionales positivos y de bienestar animal en ratas (Finlayson, 2016). Comprender mejor las experiencias emocionales positivas de los animales de laboratorio, así como las condiciones que las generan, nos permite diseñar estrategias para mejorar el bienestar animal.

Reflexiones finales

A la luz de la creciente evidencia discutida entendemos que la comunidad científica, en especial la vinculada a las biociencias, sigue teniendo por delante el desafío de replantear su vínculo con los animales de experimentación. Reconocer que los animales de

laboratorio experimentan emociones complejas nos obliga entonces a una justificación mucho más rigurosa para su utilización en experimentos.

Acompañando este avance, nuevos conceptos y principios se incorporan a los ya formulados en las 3R's. Por ejemplo, vinculado a la complejidad emocional de los animales no humanos, se plantea el Principio de Precaución. Este aconseja que en caso de que exista incertidumbre sobre la capacidad de sentir o emocional de una especie debemos actuar, e incluso legislar, a su favor, es decir si nos equivocamos, que este error sea hacia el «lado de la precaución» (Birch 2017; Browning 2022).

Es posible que el dilema en torno a este tema no sea saldado nunca, sin embargo, entendemos que la discusión sobre el uso de animales en experimentación es beneficiosa y se debe dar en forma franca y honesta, involucrando diversidad de posturas y actores de la sociedad. Creemos que la concepción de los animales de laboratorio como seres sintientes y el conocimiento generado desde la academia, aportan a una mejor práctica experimental y un mayor bienestar animal. Pero también contribuyen a la concientización de la relación de nuestra especie con otras, y del uso que hacemos de los seres vivos en general.

Bibliografía

- Andrews, K. & Monsó, S. (2020). Why don't rats get the same ethical protections as primates? <https://aeon.co/essays/why-dont-rats-get-the-same-ethical-protections-as-primates>
- Berridge, K. C., Kringelbach, M. L. (2008). Affective neuroscience of pleasure: reward in humans and animals. *Psychopharmacology*, 199(3), 457-480.
- Berridge, K. C. (2000). Measuring hedonic impact in animals and infants: microstructure of affective taste reactivity patterns. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 24(2), 173-198.
- Birch, J. (2017). Animal sentience and the precautionary principle. *Animal sentience*, 2(16), 1.
- Brejjo, M., Domínguez, L. (2019). Experimentación con animales no tradicionales en Uruguay. Capítulo 2: Principios rectores asociados a la experimentación con animales vertebrados. La realidad en Uruguay y sus regulaciones. En: Experimentación con animales no tradicionales en Uruguay. Comisión Honoraria de Experimentación Animal. Editor: Franco Teixeira de Mello. Montevideo, Uruguay. CSIC. ISBN: 978-9974-0-1728-3
- Browning, H., & Veit, W. (2022). The sentience shift in animal research. *The New Bioethics*, 1-16.
- Boissy, A., Manteuffel, G., Jensen, M. B., Moe, R. O., Spruijt, B., Keeling, L. J., ... & Aubert, A. (2007). Assessment of positive emotions in animals to improve their welfare. *Physiology & behavior*, 92(3), 375-397.
- Burgdorf, J., & Panksepp, J. (2006). The neurobiology of positive emotions. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 30(2), 173-187.
- Carbone, L.; Austin, J. (2016). Pain and laboratory animals: Publication practices for better data reproducibility and better animal welfare. *PLoS ONE*, 11, e0155001.
- Cardoso, C.V., Almeida, A. E. (2014). Laboratory animal: biological reagent or living being? *Braz J Med Biol Res.*;47(1):19-23.
- Coria-Avila GA, Pfaus JG, Orihuela A, Domínguez-Oliva A, José-Pérez N, Hernández LA, Mota-Rojas D. (2022). The Neurobiology of Behavior and Its Applicability for Animal Welfare: A Review. *Animals.*; 12(7):928.
- Darwin, C., (1872). *The expression of the emotions in man and animals*. London: John Murray, Albemarle Street.
- Decety J, Bartal IB-A, Uzefovsky F, Knafo-Noam A. (2016). Empathy as a driver of prosocial behaviour: highly conserved neurobehavioural mechanisms across species. *Phil. Trans. R. Soc. B* 371: 20150077.
- Ferreira, A., Uriarte, N. (2019). Experimentación con animales no tradicionales en Uruguay. Capítulo 1: Consideraciones éticas sobre el uso de animales no humanos en experimentación. Las tres erres como base para la regulación de la experimentación animal. En: Experimentación con animales no tradicionales en Uruguay. Comisión Honoraria de Experimentación Animal. Editor: Franco Teixeira de Mello. Montevideo, Uruguay. CSIC. ISBN: 978-9974-0-1728-3
- Finlayson, K., Lampe, J. F., Hintze, S., Würbel, H., Melotti, L. (2016). Facial Indicators of Positive Emotions in Rats. *PLoS ONE* 11(11): e0166446.
- Langford, D, Bailey, A., Chanda, M., Clarke, S., Drummond, T., Echols, S., et al. (2010). Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat Methods*. Nature Publishing Group; Jun;7(6):447-9.
- Mota-Rojas, D., Olmos-Hernández, A., Verduzco-Mendoza, A., Hernández, E., Martínez-Burnes, J., Whittaker, A.L. (2020). The Utility of Grimace Scales for Practical Pain Assessment in Laboratory Animals. *Animals*, 10, 1838.

- Panksepp, J. (2011). The basic emotional circuits of mammalian brains: do animals have affective lives? *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35(9), 1791-1804.
- Panksepp, J., & Watt, D. (2011). Why does depression hurt? Ancestral primary-process separation-distress (PANIC/GRIEF) and diminished brain reward (SEEKING) processes in the genesis of depressive affect. *Psychiatry*, 74(1), 5-13
- Reinhold, A. S., Sanguinetti-Scheck, J. I., Hartmann, K., & Brecht, M. (2019). Behavioral and neural correlates of hide-and-peek in rats. *Science*, 365(6458), 1180-1183.
- Russell, W. M. S., Burch, R. L. (1959). *The principles of humane experimental technique*. Special Edition, Universities Federation for Animal Welfare, Potters Bar, England.

Lecturas y otros recursos recomendados

- Escalas Grimace. National Centre for the replacement, refinement and reduction of animals in research (NC3rs). <https://www.nc3rs.org.uk/3rs-resources/grimace-scales>.
- La rata que amé, una historia de amor científico. Podcast, Radio ambulante. Cuando Manuel conoció a Manuela, le pareció una rata como cualquier otra. Una más que llegaba al laboratorio para que él pudiera hacer sus experimentos neurocientíficos, buscando en su cerebro diminuto respuestas sobre el misterio de la consciencia y los sueños. Pero Manuela no sería una rata como cualquier otra... no para él. <https://radioambulante.org/audio/la-rata-que-ame>

Agradecimientos

Las autoras agradecen al Dr. José Pedro Prieto por la lectura crítica y sus comentarios a este capítulo.

Capítulo X.

Nociones generales sobre métodos alternativos al uso de animales de laboratorio

La búsqueda de métodos o técnicas alternativas que permitan el reemplazo de animales de experimentación por procedimientos que no los involucren, ha sido siempre tema de interés tanto para los científicos como para la sociedad en general. En 1926 dos investigadores ingleses: William Russell y Rex Burch, en la Federación de Universidades para el Bienestar Animal (UFAW <https://www.ufaw.org.uk>) y bajo el auspicio y apoyo de Charles W. Hume fundador de la Federación, generaron la primera discusión acerca de la búsqueda de elementos alternativos que permitieran el reemplazo animal (Russell 2005; Balls 2009; Rivero 2019).

La discusión de Russell y Burch se basó en el trabajo del fisiólogo británico Marshall Hall, quien ya en 1831 estableció cinco puntos acerca de la forma en las que se debería llevar a cabo la experimentación animal, comenzando así el debate sobre el tema (Zurlo, 1994). Como vimos en el Cap. I, Hall proponía que:

- Un experimento no debe realizarse si puede ser sustituido por simple observación.
- Ningún experimento debe realizarse sin tener objetivos bien definidos.

- Los científicos deben estar bien informados acerca de los experimentos de sus colegas, para evitar las repeticiones innecesarias de experimentos.
- Los experimentos justificados se deberán de realizar provocando el menor sufrimiento a los animales (a menudo mediante el uso de animales inferiores menos sensibles).
- Todo experimento debe realizarse bajo circunstancias que proporcionen los resultados más claros posibles, disminuyendo la repetición de experimentos.

A partir de estos postulados, Russell y Burch definieron como técnica de reemplazo a «cualquier método científico que emplee material no sensible y que pudiera reemplazar el uso de vertebrados vivos conscientes en experimentación animal». En este contexto todos los métodos o técnicas que permitan sustituir el uso de animales en experimentación o docencia, reducir el número de ejemplares, disminuir el stress e impedir el sufrimiento de animales, son incluidos en la categoría de reemplazo. El reemplazo puede ser de dos tipos: a) Relativo: en el que el animal pudiera ser requerido en alguna fase del ensayo, pero no expuesto a situaciones de tensión o stress; b) Absoluto: cuando el animal no es requerido en

ninguna fase de experimento, siendo este último por el que la comunidad se inclina y el que más retos plantea (Vinardell Martinez, 2021).

Presente y futuro

Si bien la tendencia mundial al reemplazo relativo o absoluto en el uso de animales de experimentación es muy clara, la oferta de métodos y modelos que permitan la obtención de datos confiables ha comenzado a ser eficiente solo a partir de hace muy poco tiempo, incluso en los países más desarrollados (Doke 2015; EURL ECVAM 2018). Así encontramos que el primer congreso sobre alternativas y uso de animales en ciencia se realizó en 1993, organizado por él Johns Hopkins Center en Baltimore, USA. En este primer congreso ya se planteaba la preocupación y proponía la búsqueda de ensayos y mecanismos alternativos validados que permitieran garantizar la obtención de modelos que llevaran a la reducción del uso de animales de experimentación.

Para que el reemplazo resulte adecuado, el modelo que se proponga deberá resultar de (Balls, 1983; 1993 y 2013):

- a. la búsqueda exhaustiva de fuentes de información existente;

- b. la necesaria reproducción de los procesos fisiológicos, y
- c. la capacidad predictiva del modelo, es decir la comprobación de predicciones basadas en las relaciones de estructura y actividad.

Deberá además promover:

- a. la utilización de animales invertebrados y organismos vegetales y del reino fungi;
- b. la utilización de modelos in vitro: cultivos y órganos perfundidos;
- c. la utilización de vertebrados en etapas tempranas de desarrollo;
- d. la realización de estudios en humanos voluntarios, y
- e. la utilización de resultados derivados de investigaciones epidemiológicas.

Las posteriores reuniones que se han realizado para discutir el tema concuerdan en que un buen modelo no solo debe reemplazar el uso de animales de experimentación, sino que además debe de reproducir los fenómenos y procesos biológicos de manera simple y eficiente; de tal forma que su uso resulte en datos que puedan ser utilizados de forma confiable. Además, los modelos de reemplazo deben estar disponibles para su uso en diversos laboratorios; lo que significaría que deben de obtenerse de forma fácil y ser

económicos. Las características deseables incorporan, además, ser duradero y dúctiles (es decir poseer atributos que le permitan adaptarse a diferentes condiciones experimentales), e incluso se ha postulado que no debe ser sofisticado (Balls, 1993 y 1999).

Al listado de características a cumplir por el método alternativo, debe sumarse su validación. Este procedimiento se define como el proceso por el cual se establece la fiabilidad e importancia de un método con un objetivo bien definido. La fiabilidad está relacionada con la reproducibilidad intra e interlaboratorio, así como que sea fácilmente transferible. Por su parte la importancia del método se basa en las bases científicas del mismo y en su capacidad predictiva (Balls 1999 y 2015, Prior 2019).

Los modelos propuestos y que se encuentran en uso pueden agruparse en dos grandes categorías: los que utilizan sistemas vivos y los teóricos en los que se utilizan modelos no vivos (Vinardell Martínez, 2021). Los modelos que proponen el uso de «sistemas vivos» incluyen el uso cultivos celulares y de órganos o tejidos; así como la obtención de datos a partir del uso de animales invertebrados. Los relacionados con el uso de cultivos han dado algunos resultados, pero resultan costosos y en muchos casos no replican condiciones asociadas a la edad o de estacionalidad; no obstante, han resultado satisfactorios ya que logran homogeneidad y repetibilidad de los datos que se obtienen. Por otro lado, la recomendación para el uso de microorganismos (bacterias, levaduras) e invertebrados (insectos, moluscos), así como embriones de peces o de aves, argumentan la

ausencia de un sistema nervioso en los microorganismos y en los demás la presencia de un sistema nervioso primitivo o aun no desarrollado, en los que la sensación de dolor es mínima o no existe. Su uso se ha implementado sobre todo para el estudio de mecanismos de virulencia, el uso de antimicrobianos y para comprender fenómenos de respuesta inmune. Los datos obtenidos han permitido avanzar, pero la objeción más enérgica se encuentra al querer extrapolar los resultados obtenidos a organismos más complejos, ya que es obvia la diferencia entre las categorías taxonómicas y la clara distancia evolutiva o de desarrollo (Vinardell Martínez 2014; Aguiano-Robledo 2018).

Los modelos que incluyen sistemas *no vivos* abarcan aquellos que utilizan bases de datos y sistemas físicos, químicos y computacionales que simulan funciones biológicas y sus interacciones fisiológicas, bioquímicas, patológicas y toxicológicas, etc. Esta corriente propone además la inclusión de grupos humanos voluntarios en los que se llevan a cabo estudios epidemiológicos y toxicológicos. Esta categoría ha encontrado resistencia debido a el componente ético que implica la incorporación de personas como sujetos de experimentación (Vinardell Martínez, 2014). En cualquiera de las situaciones (uso de modelos vivos y no vivos), lo que resulta claro es que en cualquier tipo de estudio se debe incorporar la aplicación de protocolos normalizados de trabajo, la selección del mejor diseño experimental y la incorporación y uso de información obtenida en estudios previos; acciones todas que resultan en la optimización del trabajo y obtención de resultados confiables.

Es necesario recalcar que poder contar con modelos alternativos al uso de animales de experimentación ha comenzado a ser posible gracias al avance en el conocimiento profundo de las especies involucradas, el desarrollo de tecnologías y la creación y vigilancia de leyes que regulen el uso de animales de forma ética y responsable (Roi 2013; Aguiano Robledo 2018).

La utilización de modelos alternativos otorga (en la mayoría de los casos) ventajas técnicas y económicas ya que resultan reproducibles, rápidos y al parecer de menor costo; además se pueden repetir mayor cantidad de veces y los resultados que se obtienen son más consistentes (Rivero 2019; Vinardell Martínez 2021).

Actualmente y debido a la prohibición desde 2013 en la UE del uso de animales en test para productos cosméticos, surgió la necesidad de métodos alternativos que suplieran el uso de animales en esta área. Un ejemplo de ello es el desarrollo del primer test *in vitro* que reemplaza el uso de animales para la determinación de irritación/corrosión dérmica validado por Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (EURL ECVAM), este desarrollo fue liderado por la empresa L'Oreal (<https://www.loreal.com/en/commitments-and-responsibilities/for-the-planet/for-beauty-with-no-animal-testing/milestones-in-the-safety-assessment-without-animal/>) (Spielmann 2008; Motter Catarino 2018; Pellevosin 2018). Otro ejemplo es el uso de ojo aislado de pollo para reemplazar el test de Draize en conejos, siendo en este caso un reemplazo relativo (Prinsen, 2017)

En América Latina, existen dos Federaciones que nuclean a las diferentes asociaciones de animales de laboratorio de los países miembro ellas son: la Federación de Sociedades Sudamericanas de Ciencias de Animales de Laboratorio (FESSACAL) y la Federación de Sociedades y Asociaciones Hispánicas de América del Norte, Centroamérica y el Caribe, de las Ciencias de los Animales de Laboratorio (FESAHANCCCAL). Ambas federaciones organizan desde hace varios años el Congreso sobre Métodos Alternativos al Uso de Animales en Educación, Investigación e Industria. En estos congresos participan investigadores del área, autoridades sanitarias y reguladoras, organizaciones no gubernamentales y empresas e industrias de sectores afines. El fin de estas reuniones científicas es el formar en las 3R's, estar al día en todos los avances existentes en métodos alternativos y su validación, siendo un lugar de encuentro de los esfuerzos de la comunidad científica y sociedad en general para revisar, discutir y difundir las más importantes e innovadoras tecnologías, métodos y recomendaciones para Reemplazar, Reducir y Refinar el uso de animales en la investigación científica, el aseguramiento de la calidad, las pruebas diagnósticas, el desarrollo tecnológico y la docencia. En 2022 se llevó a cabo la IV reunión en la ciudad de México (<https://colama.org>).

¿Dónde buscar? ¿A quién acudir?

Otra de las preocupaciones que se suman a la problemática de selección de un modelo alternativo, radica en que los investigadores se encuentran poco

informados acerca de qué herramientas existen, cuándo y cómo se deben aplicar. En este sentido se hace necesaria entonces la difusión de las fuentes en las que se localicen los métodos alternativos existentes y que dichas fuentes sean además de manejo sencillo y práctico. En años recientes, diferentes organismos alrededor del mundo se han preocupado por la elaboración de guías y listas de lugares en los cuáles los interesados pueden buscar información relacionada con el reemplazo de animales de experimentación por otros modelos.

En la Comunidad Europea, por ejemplo, en 2011 y bajo la directiva 2010/63/EC, el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM) se convierte en el laboratorio de referencia de la Unión Europea para Alternativas a la Experimentación con Animales (European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing: EURL-ECVAM). En su sitio web se puede encontrar una guía y una *check list* que considera las palabras clave a utilizar y las estrategias de la búsqueda, lo que permite una búsqueda sistematizada de un tema en particular. También proporciona una lista de las revistas más relevantes en el tema (<https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/books/eurl-ecvam-search-guide-good-search-practice-animal-alternatives>).

De igual forma en Estados Unidos en el año 2000 se crea el Comité Coordinador Interagencias sobre la Validación de Métodos Alternativos (Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods ICCVAM) (<https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/>)

niceatm/iccvam/index.html), en Japón se llama *ja-CVAM* (<https://www.jacvam.jp/en/index.html>) y en América del Sur tenemos en Brasil el *braCVAM* (<http://www.bracvam.fiocruz.br>). Todas estas agencias en sus páginas web brindan información referente a métodos alternativos.

La Red Española de Métodos Alternativos (REMA) (<http://www.remanet.net>) ha creado una página web con herramientas de búsqueda de alternativas de reemplazo. Además, con el fin de incentivar a los docentes con el uso de herramientas alternativas al uso de animales en la enseñanza, se creó InterNICHE (<https://www.interniche.org/es>) una red internacional que busca una educación más humanitaria y que contiene una base de datos con más de 1000 alternativas clasificadas por disciplinas y tipología (Rivero 2019; Vinardell Martínez 2021). Según la bibliografía, en España el desarrollo de enfoques y métodos alternativos ha conseguido reducir el número de animales usados en experimentación hasta en un 80 % (Anguiano-Robledo, 2018).

Como se ha mencionado existen diferentes organizaciones y agencias internacionales dedicadas a la búsqueda, validación y financiación de métodos alternativos, a continuación les brindamos un listado de algunas de ellas:

1. Alternatives to animal testing (ICCVAM): <https://www.niehs.nih.gov/health/topics/science/sya-iccvam/index.cfm>

2. Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments (FRAME): <https://frame.org.uk>
3. European Research Group for Alternatives in Toxicity Testing (ERGATT): <https://uia.org/s/or/en/1100061624>
4. Norwegian Inventory of Alternatives (NORINA): <https://norecopa.no/norina>
5. The European Resource Centre for Alternatives in Higher Education: <http://www.eurca.org>
6. EU Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL ECVAM): https://joint-research-centre.ec.europa.eu/eu-reference-laboratory-alternatives-animal-testing-eurl-ecvam_en
7. Center for Alternatives to Animal Testing (CAAT): <https://caat.jhsph.edu>

- Los beneficios del reemplazo no resultan solo en el campo de la bioética, sino que resulta en el mejoramiento de las condiciones en las que se diseñan y realizan los experimentos y además reduce el número de factores que pueden alterar los resultados.
- A pesar de los esfuerzos para difundir el concepto de métodos alternativos, existe poca aceptación de las alternativas de reemplazo por parte de la comunidad científica, debida principalmente a un desconocimiento de la realidad de los métodos que no utilizan animales.
- Es fundamental e imperioso realizar una búsqueda bibliográfica adecuada antes de plantear una metodología con animales de experimentación.

Conclusiones

- Se debe fomentar la investigación de modelos alternativos y difundir el resultado de estas investigaciones para impulsarlos y mejorarlos.
- El uso de animales para propósitos científicos o educativos *solo* debería de plantearse cuando no exista otra alternativa y estar asociado a la optimización de las 3R's.

Bibliografía

- Anguiano-Robledo (2018): Alternatives to Animal Experimentation: Its Institutional Teaching and Scientific DOI: 10.5772/intechopen.74941
- Balls, M., Riddell, R.J., and Worden, A.N. eds. (1983). *Animals and Alternatives in Toxicity Testing*. London: Academic Press. <https://doi.org/10.1177/026119298301100205>
- Balls M. 1993 Alternatives to Animal Experimentation, Volume: 11 issue: 2, page(s): 56-62 <https://doi.org/10.1177/0261192983011000>.
- Balls M, Fentem JH. (1999) The validation and acceptance of alternatives to animal testing. *Toxicol In Vitro*. 13(4-5):837-46. doi: 10.1016/S0887-2333(99)00067-3. PMID: 20654558.
- Balls, M. (2009). The origins and early days of the Three Rs concept. *ATLA* 37, 255-265.
- Balls M. (2013): The wisdom of Russell and Burch. *Alternatives to Laboratory Animals* 41(6):P82-P84. doi:10.1177/026119291304100628
- Balls, M. (2015). 19. Russell and Burch after 1959. *Alternatives to Laboratory Animals : ATLA*, 43(5), P59-60. Council European Parliament. Directive 2010/63/EU
- Doke S, Dhawale S (2015): Alternatives to animal testing: a review. *Saudi Pharmaceutical Journal* 23: 223-229
- EURL ECVAM Status Report (2018): On the development, validation and regulatory acceptance of alternative methods and approaches. Joint Research Centre (JRC), European Commission. Editors: Zuang V. & Dura A. doi:10.2760/818599
- Holley, T., Bowe, G., Campia, I., Belz, S., Berggren, E., Janusch-Roi, A., ... & Whelan, M. (2016). Accelerating progress in the Replacement, Reduction and Refinement of animal testing through better knowledge sharing. Joint Research Centre (JRC) Science for Policy Report. DOI: 10.2788/934083
- MacArthur CJ. (2018) The 3Rs in research: a contemporary approach to replacement, reduction and refinement. *Br J Nutr*. 120(s1): S1-S7
- Motter Catarino C, Nascimento T, Comune P, Romano S, Gimenes F, Lopes M, Berlanga S, Stucki S (2018): Skin corrosion test: a comparison between reconstructed human epidemic and full thickness skin models. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 125: 51-57
- Pellevoisin C, Videau C, Briotet D, Gregoire C, Tornier C, Alonso A, Rigaudeau A, Boules C, Seyler N (2018): SkinEthic RHE for in vitro evaluation of skin irritation of medical device extracts *Toxicology in Vitro* 50: 418-425. DOI 10.1016/j.tiv.2018.01.008
- Prinsen M, Hendriksen C, Krul C, Woutersen R (2017): The isolated chicken eye test to replace the Draize test in rabbits. *Regulatory Toxicology* 85: 132-149
- Prior H, Casey W, Kimber I, Whelan M, Sewell F (2019): Reflections on the progress towards non-animal methods for acute toxicity testing chemicals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 102: 30-33
- Rivero, M. N., Lenze, M., Izaguirre, M., Wikinski, S. I., & Gutiérrez, M. L. (2019). Tendencia al reemplazo de animales de experimentación. *Question/Cuestión*, 1(64). <https://doi.org/10.24215/16696581e239>
- Roi A, Grune B. (2013): The EURL ECVAM Search Guide: Good Search Practice to Animal Alternatives. *EUR EUR* 24391 EN. EC-Joint Research Centre. JRC88200
- Russell, W.M.S. (2005). The Three Rs: Past, present and future. *Animal Welfare* 14, 279-286.

- Spielmann H, Liebsch M (2008): The ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test. *Alternatives to Laboratory Animals* ATLA 35 (6): 559-601. DOI: 10.1177/026119290703500614
- Vinardell, Martinez Hidalgo (2014) Alternativas a los animales de laboratorio en la docencia. *Rev. Toxicol*; 31(2), 124-9.
- Vinardell Martinez Hidalgo (2021): ¿Existen alternativas a los experimentos con animales? *Revista Bioética y Derecho*; 51: 81-97 versión On-line ISSN 1886-5887
- Zurlo J, Rudacille D, and Goldberg AM. Animals and alternatives in testing (1994): «Animal Experimentation: Ethics and Law». In: *Animals and Alternatives in Testing History, Science, and Ethics*. Mary Ann Liebert, Inc.

Anexo I

Ordenanza sobre uso de Animales en Experimentación, Docencia e Investigación Universitaria

Resolución n.º 11 del CDC
de 21/XII/1999. Distribuido n.º 295/99,
D. O. 21/II/2000

Exposición de motivos

La experimentación animal ha sido base fundamental de los grandes avances de los conocimientos biológicos y del bienestar del hombre y de los animales, en particular porque ha esclarecido las causas, los mecanismos, así como el tratamiento y la prevención de muchas enfermedades.

Tanto las investigaciones biológicas básicas como las investigaciones aplicadas han determinado muchos e importantes adelantos de la ciencia médica.

Resulta indispensable seguir realizando investigaciones de ambas clases con el fin de descubrir las causas, mecanismos, prevención y tratamiento de enfermedades que aún no son bien conocidas por el hombre, así como para probar la eficacia e inocuidad de muchos de los principios activos utilizados en medicina humana y veterinaria, y en general para avanzar en el conocimiento biológico.

Un requisito importante estipulado en los códigos de ética internacionales (OMS, OPS) y en muchas legislaciones

nacionales para experimentación en seres humanos, es que no se deben emplear nuevas sustancias ni dispositivos en seres humanos, a menos que las pruebas previamente efectuadas en animales, permitan hacer una suposición razonable de su inocuidad.

En medicina humana y veterinaria se utilizan animales en investigaciones fisiológicas, patológicas, farmacológicas, toxicológicas, terapéuticas y de conducta, en cirugía experimental, en ensayos de medicamentos y preparados biológicos, y también con fines docentes en todas estas disciplinas, incluyendo la formación quirúrgica.

Además de los experimentos, los animales son indispensables para probar la potencia e inocuidad de muchas de las sustancias biológicas utilizadas en medicina humana y veterinaria.

Las pruebas de actividad biológica son, además, esenciales para las numerosas sustancias sintéticas que jamás existieron en la naturaleza: productos farmacéuticos, aditivos alimentarios y productos químicos agrícolas, y es evidente que dichas pruebas solo pueden realizarse con animales, aunque los sujetos de las pruebas definitivas tengan que ser seres humanos en contacto directo o indirecto con las mencionadas sustancias.

La investigación espacial también ha requerido y requiere la utilización de animales de experimentación.

Se han descrito más de 1:200.000 especies de animales, pero el 97 % de los utilizados en experimentación biológica pertenecen a 9 categorías: rata, ratón, cobayo, conejo, hámster, perro, gato, pollo y mono.

Otros, menos comunes, son peces, víboras, lechuza, murciélagos, ovejas, palomas, armadillo, etc.

El animal seleccionado depende del objetivo de la investigación a realizarse.

Se estima que el número de animales que se utilizan anualmente con fines biomédicos oscila entre 1 000 000 en la India y 6 000 000 en el Japón, con una cifra intermedia de 2 000 000 en Canadá.

El empleo de animales en investigación y docencia involucra responsabilidad de los investigadores respecto de los animales de experimentación, en cuanto a que estos deben ser tratados como seres sensibles, deben ser criados, alimentados y atendidos según sus necesidades, evitando o minimizando su posible incomodidad, sufrimiento físico y dolor.

Estos imperativos éticos de conducta, de todo el personal que trabaja con animales de experimentación, se asegurará por un doble mecanismo:

a) Formación y adiestramiento de todo el personal en el trabajo con animales de experimentación, a través de

cursos de capacitación con dicho fin en los que se estimulará el interés humanitario por dichos animales.

b) Vigilancia y acciones disciplinarias por parte de la autoridad Univesitaria, por medio de disposiciones, reglamentos y normas estipuladas en tal sentido.

La Universidad de la República se adhiere a los Principios Rectores internacionales aplicables a las investigaciones biomédicas con animales del Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas, aprobado por el Comité Consultivo de Investigaciones Médicas de la OMS (Cronica, de la OMS 39: 5560, 1985) y a las Normas Internacionales para la investigación biomédica con animales de la OPS (Bol Of Sanit Panam 108(5-6), 1990) que incluye los antedichos Principios Rectores de la OMS.

Estos principios rectores proporcionan un marco conceptual y ético, aceptable tanto por la comunidad biomédica internacional como por las sociedades protectoras de animales responsables, y están fundamentados en las siguientes reglas:

a. El uso de animales con fines científicos no es por sí deseable.

b. Siempre que sea posible deben utilizarse otros métodos.

c. En el estado actual de los conocimientos es inevitable recurrir al uso de animales.

d. Los científicos tienen la obligación moral de tratar humanitariamente a los animales, evitándoles en lo posible toda molestia y dolor, y teniendo siempre presente la

posibilidad de obtener los mismos resultados sin necesidad de recurrir a animales vivos.

Corresponde entonces que la Universidad redacte sin más dilaciones, una Ordenanza que defina con precisión las condiciones y límites del uso de animales en la docencia e investigación, de acuerdo con los siguientes principios:

Principios básicos

I.- El progreso de los conocimientos biológicos y el perfeccionamiento de los medios de protección de la salud y el bienestar del hombre y de los animales, obliga a hacer experimentos con animales vivos de especies muy diversas.

II.- Siempre que sea posible deberán utilizarse métodos alternativos, es decir la sustitución de los animales vivos por otros procedimientos, como los basados en modelos matemáticos, simulación por computador y sistemas biológicos *in vitro*.

Tales métodos se consideran complementarios al uso de animales intactos, y su desarrollo y uso deberá fomentarse por razones científicas y humanitarias.

III.- Solo deberán emprenderse experimentos con animales, tras ponderar debidamente si redundan en beneficio de la salud humana o animal y del progreso de los conocimientos biológicos.

IV.- Los animales seleccionados para un experimento deben ser de la especie y calidad adecuadas, y no exceder del

número mínimo necesario para obtener resultados científicamente válidos.

V.- Los investigadores y demás personal deberán tratar siempre a los animales como seres sensibles, y como imperativo ético prestarles la debida atención y cuidado, evitándoles o minimizando en lo posible toda molestia, intranquilidad o dolor.

VI.- Aunque haya que mejorar los conocimientos sobre la percepción del dolor por los animales, los investigadores deberán suponer que cualquier procedimiento susceptible de causar dolor al ser humano, también lo causará a otras especies de vertebrados.

VII.- No deberán realizarse intervenciones dolorosas, sean quirúrgicas o de otra naturaleza, en animales paralizados con agentes químicos.

VIII.- Toda manipulación de un animal que pueda causarle un dolor o una molestia momentáneos o mínimos, deberá hacerse previa sedación, analgesia o anestesia adecuada según las prácticas veterinarias aceptadas.

En caso de que haya que dejar en suspenso tal disposición, la decisión al respecto no deberá depender únicamente de los investigadores interesados, sino que habrá de tomarla un organismo de revisión adecuadamente constituido, teniendo en cuenta lo antes expresado.

La suspensión del artículo VII no deberá basarse jamás en razones de enseñanza o de demostración.

IX.- Al final de un experimento o, cuando proceda durante el mismo, se debe dar muerte, por un procedimiento no doloroso, a los animales que, de lo contrario, padecerán dolores, sufrimientos o incapacidades graves o crónicas imposibles de aliviar.

X.- Los animales empleados para fines biomédicos se deben mantener en las mejores condiciones de vida posibles. De ordinario, hay que cuidarlos bajo supervisión de profesionales expertos en el cuidado de animales de Laboratorio. En todo caso, será preciso disponer de los servicios de atención veterinaria que se necesiten.

XI.- El responsable de todo instituto o departamento donde se utilicen animales, debe asegurar que los investigadores y el personal restante tengan la idoneidad y experiencia necesarias para realizar determinados procedimientos con animales.

Deberán darse oportunidades de formación en el mismo servicio, enseñando a los interesados a atender adecuada y humanitariamente a los animales a su cargo.

Métodos alternativos de experimentación sin animales

Quedan muchos campos de investigación biomédica en los que, al menos en el futuro inmediato, se necesitará experimentar con animales.

Un animal vivo intacto es más que una suma de reacciones de células, tejidos u órganos independientes; existen

complejas interacciones en el animal completo, que los métodos alternativos biológicos o de otra índole no permiten duplicar.

El término alternativo ha sido empleado a veces para referirse a la sustitución de los animales vivos por otros procedimientos, y a los métodos destinados a reducir el número de animales necesarios o perfeccionar los procedimientos de experimentación.

La consideración de conflicto moral que reconoce tanto la necesidad de realizar investigación biomédica utilizando animales, como la obligación de minimizar su sufrimiento, se resume en lo que Russell y Burch proponen como las tres R de Russell (Reemplazo, Refinamiento y Reducción de animales en la experimentación biológica), que estimula al uso de alternativas en la investigación con animales de laboratorio.

Los procedimientos de experimentación considerados «alternativos», comprenden métodos biológicos y no biológicos.

Estos últimos incluyen modelos matemáticos de las relaciones entre la estructura y la actividad, basados en las propiedades fisicoquímicas, de los medicamentos y otras sustancias químicas y modelos computadorizados de otros procesos biológicos.

Los modelos biológicos incluyen empleo de microorganismos, preparaciones in vitro (fracciones subcelulares, sistemas celulares de corta duración, perfusión de órganos completos y cultivo de células y órganos) y, en algunos casos, embriones de invertebrados y vertebrados.

Además de los procedimientos de experimentación, otros métodos de gran importancia son las investigaciones epidemiológicas retrospectivas y prospectivas sobre poblaciones humanas y animales.

La adopción de métodos alternativos se considera complementaria al uso de animales intactos, y su desarrollo y uso deberán fomentarse activamente por razones científicas y humanas.

Proyecto de ordenanza

Capítulo I.

Concepto de bioterio y laboratorio de experimentación

Artículo 1.- Conceptos.- Se denomina bioterio al lugar especialmente adecuado, donde se realiza la cría, mantenimiento y experimentación de los animales de laboratorio, con fines de investigación, terapéuticos o docentes.

Se denomina laboratorio de experimentación al lugar especialmente adecuado, donde se realizan experimentos con animales, con fines de investigación o docencia.- Podrá o no, estar físicamente incluido en el bioterio.-

Capítulo II.

Organización y funcionamiento de los bioterios y laboratorios de experimentación

A.- Ubicación y características generales

Artículo 2.- Caracteres de los locales.-

Los locales de producción, mantenimiento o experimentación animal no podrán estar en relación directa con áreas administrativas; y deberán encontrarse aislados del exterior. Los destinados a animales de producción deberán contar con zonas amplias, al aire libre y con un monte de abrigo como de protección, y estarán sujetos a otra reglamentación que elaborará la CHEA.

Los Bioterios deberán contar:

a) con paredes y pisos recubiertos por material de fácil lavado, resistente a desinfectantes; techos lisos y uniformes y fáciles de limpiar; cierres herméticos en las puertas, etc.

b) y con factores controlados: ambientales (temperatura, humedad, ventilación, etc.), fisicoquímicos (iluminación, ruido, contaminantes, sanitizantes, etc.), habitacionales (forma, tamaño, tipo, población de jaulas), nutricionales (dietas, agua, esquema de alimentación, etc.), parásitos, situación experimental.

Artículo 3.- Sistemas de ventilación.- Los sistemas de ventilación o de aire acondicionado, serán exclusivos para el sector Bioterio, no pudiendo ser compartidos con otras áreas.-

En todas las áreas cerradas donde se alojen los animales, la ventilación será positiva, de forma tal de evitar el ingreso de patógenos desde el exterior.

Artículo 4.- Estabularios.- Los estabularios se dividirán en:

(a) Laboratorios de experimentación.-

Son áreas exclusivamente de experimentación, en las cuales los animales son mantenidos para satisfacer un protocolo de investigación, que pueden o no estar incluidas en el mismo lugar donde se realiza la producción, cría y mantenimiento de animales.

(b) Bioterios de producción o ciclo completo, en el cual se llevará a cabo la reproducción, cría y mantenimiento de los animales.-

Las instalaciones para animales deberán contar con condiciones físicas y de diseño, que aseguren la eficacia de su funcionamiento.

Las instalaciones para animales deberán estar separadas de las oficinas, y otros espacios de permanencia del personal.-

Los animales que requieran ser mantenidos en laboratorio para satisfacer protocolos de investigación, deberán estar ubicados en áreas apropiadamente adecuadas, para alojarlos y cuidarlos.-

Artículo 5.- Infraestructura de los Bioterios.- Los bioterios de producción o ciclo completo deberán contar con:

5.1.- Local de Cría y de Producción, destinado únicamente a los animales en apareo (pie de cría) y su progenie lactante.

En el mismo deberán llevarse Registros de:

1.- Sistema de apareamiento utilizado.

2.- Fecha de parto.

3.- Fecha de destete.

4.- Cantidad de crías destetadas.

5.- Su destino.

5.2.- Local de Mantenimiento o Stock, destinado a los animales que son mantenidos para su posterior uso.

Los animales deben estar identificados llevándose Registros de:

1.- Muertes espontáneas o por eutanasia.-

2.- Resultado de las necropsias y causa probable de muerte.-

3.- Destino de los animales.-

Por razones de espacio o cuando la magnitud de la producción de animales no justificará locales independientes, la cría y el mantenimiento de una especie podrá realizarse en el mismo local, con capacidad suficiente para evitar la sobrecarga animal.

En ningún caso se podrán albergar especies diferentes dentro de una misma área.

5.3.- Local de Experimentación Animal, en el que los animales permanecerán solo durante el transcurso de la experiencia, los cuales, por razones de bioseguridad serán eliminados, una vez finalizado el trabajo de investigación.-

5.4.- Local o área de cuarentena, donde se mantendrán los animales introducidos del exterior durante el tiempo prudencial para descartar posibles patologías.

El manejo diario de los animales en cuarentena se realizará en último término por parte del personal, de forma tal de evitar el contagio de infecciones.

5.5.- Área o local de depósito, que constará de:

1.- Depósito de material limpio, para el almacenamiento de jaulas, bebederos, etc.

2.- Depósito de alimentos, donde se almacenarán los alimentos de las especies en estudio.

Dichos depósitos deberán contar con la ventilación y temperatura adecuada que garantice el mantenimiento de la calidad del alimento, y debe estar aislado del ingreso de vectores de enfermedades infecciosas.

3.- Depósito de material autoclavado.

En caso de trabajarse con material autoclavado, el mismo debe ser mantenido en forma aislada y bajo radiación ultravioleta.

5.6.- Área o local de lavadero.

5.7.- Área de procedimientos quirúrgicos.-

5.8.- Áreas para el aseo del personal y para la administración.

Artículo 6.- Registros.-

Deberá llevarse un registro donde conste la fecha de ingreso de los animales, los controles realizados y la fecha en la cual fueron trasladados a las distintas áreas.

Asimismo, deberá llevarse un Registro de todos los experimentos efectuados con animales y facilitarlos para inspección; en el que habrá de incluirse información sobre los diversos procedimientos realizados y los resultados de los exámenes *post mortem* que se practiquen.

B.- Condiciones ambientales

Artículo 7.- Aire y ventilación.

Las condiciones ambientales de temperatura, humedad, ventilación, alumbrado e interacción con otros animales deberán ser compatibles con las necesidades de la especie en cuestión, contando con espacios al aire libre en casos en que sean requeridos.

Los ruidos y olores deberán minimizarse dentro de lo posible.

Habrán de existir las instalaciones apropiadas para cadáveres y desechos.

Los locales deberán contar con las siguientes exigencias de aire y ventilación:

7.1.- La inyección de aire debe realizarse en los ángulos superiores de los locales y la extracción en los inferiores.

7.2.- Los locales en su interior deben poseer presión positiva de aire respecto a los pasillos o áreas exteriores.

7.3- En caso de poseer un bioterio doble pasillo con locales centrales (Circulación limpia y sucia), el gradiente de presión será del limpio al sucio.

Artículo 8.- Temperatura y humedad.

Las exigencias de temperatura y humedad son:

8.1- Para roedores de 20-24 °C.-

8.2.- La humedad relativa ambiente oscilará entre 40 y 70 %.

Artículo 9.- Intensidad y tipo de iluminación. Los locales deberán contar con las siguientes exigencias de intensidad y tipo de iluminación:

9.1.- La luz deberá ser artificial y provista por tubos fluorescentes con incidencia oblicua, de forma tal que todas las jaulas, independientemente de su ubicación, reciban intensidades similares.

C.- Alojamiento de animales y material para lechos

Artículo 10.- Condiciones de alojamiento.-

El alojamiento debe contribuir a la salud general de los animales, y evitarles todo estrés innecesario, para lo cual deberá asignársele a cada animal, de acuerdo a la especie, un espacio adecuado, preservando mínimas condiciones de

higiene y de protección contra depredadores, roedores y otras plagas.

Deberán existir instalaciones de cuarentena y aislamientos pertinentes.

Normalmente la entrada debe estar restringida a las personas autorizadas.

Los animales serán alojados en jaulas adecuadas para cada especie.

El área requerida para cada especie se ajustará a las disposiciones vigentes.

El número de animales por jaula estará en relación con el tamaño corporal evitándose la sobrecarga, de acuerdo con la reglamentación emitida por la CHEA.-

Artículo 11.- Lechos.-

Los lechos serán de materiales absorbentes, libres de sustancias tóxicas y estarán esterilizados.-

D.- Adquisición de animales

Artículo 12.- Los animales de experimentación serán adquiridos en establecimientos de cría especializados.

Podrán emplearse animales no específicamente criados con este fin, solo si se observan los requisitos establecidos en materia de investigación, sobre todo en lo que respecta a su salud y calidad.

E.- Alimentación

Artículo 13.- Exigencias de los alimentos.-

Los animales deben recibir alimentos en cantidad y calidad suficiente para sus necesidades y para conservar la salud, y tener acceso libre al agua potable, a menos que el objeto del experimento sea estudiar los efectos de las variaciones de esos nutrientes.

El alimento que se le suministre a los animales deberá reunir las siguientes exigencias:

- a) su composición deberá cubrir las necesidades nutritivas de la especie a la que está destinado;
- b) su envase debe poseer rótulo con la marca del producto visible;
- c) el número de partida;
- d) el análisis de composición química de la partida; y
- e) la fecha de elaboración.

Deberá ser envasado de forma tal que asegure su traslado y almacenamiento higiénico.-

Artículo 14.- Vencimiento de los alimentos

El alimento no podrá tener más de un año de elaborado al momento de ser suministrado a los animales.

F.- Sanidad

Artículo 15.- Calidad sanitaria.- Deberá haber servicios de atención veterinaria, que incluyan vigilancia y prevención de las enfermedades, a disposición de los establecimientos de cría y de las instituciones o departamentos que emplean animales con fines biomédicos.

Los animales enfermos o lesionados deben recibir atención apropiada, o una muerte no dolorosa.

Deberá acreditarse la calidad sanitaria de los animales, producidos o adquiridos, mediante estudios adecuados que certifiquen la ausencia de enfermedades que puedan interferir con los resultados experimentales.

Deberán contar con sistemas de barreras que posean determinadas características:

- a) Ubicación del bioterio fuera del alcance de peligros sanitarios; utilización de materiales y sistemas que eviten el alojamiento de plagas y faciliten la sanitización.
- b) Filtración de aire y manejo de presiones diferenciales.
- c) Barreras anti-roedores y anti-insectos.
- d) Limitación de acceso de personal.

El personal debe estar adecuadamente capacitado en el mantenimiento de buenas condiciones de higiene y en la aplicación de todas las medidas necesarias para prevenir la contaminación.

Flujo de personal y materiales por las zonas indicadas, para evitar diseminación de material contaminado en zonas limpias.

Capítulo III.

Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA)

Art. 16.- Fines, sede y presupuesto.- Se crea la Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la Universidad de la República (CHEA), con la finalidad de garantizar el cumplimiento de estos objetivos:

a) Asegurar a los investigadores las mejores condiciones de trabajo, así como el resultado de sus experimentos en animales.

b) Evitar el uso excesivo o inapropiado de animales de experimentación.

c) Acreditar la formación de los investigadores, docentes y todo el personal en el cuidado, crianza, empleo y trato humanitario de los animales de experimentación antes, durante y después del experimento.-

La CHEA se asimilará en carácter transitorio a una Comisión central, adjudicándosele sede, así como infraestructura y personal administrativo necesario para cumplir sus funciones.-

Durante ese período transitorio y mediante un estudio de las necesidades requeridas, acorde con las tareas desempeñadas, la CHEA realizará una propuesta presupuestal que

será presentada para su consideración, votación y asignación, en el próximo presupuesto quinquenal.-

Art. 17.- Integración y duración.- La CHEA estará integrada por:

a) Un representante designado por cada uno de los servicios universitarios en los que se realice experimentación animal.-

b) Un representante designado por el Rector, que la presidirá.-

Los miembros de la CHEA durarán cuatro años en sus funciones, pudiendo ser reelectos.-

Dichos miembros podrán ser removidos en cualquier momento por el CDC.-

Art. 18.- Cometidos de la CHEA.- Compete a la CHEA:

a) Cumplir y hacer cumplir las normas universitarias vigentes en la materia en cuanto al cuidado y empleo de los animales de experimentación.-

b) Dictar instrucciones de servicio o normas de trabajo relativas a la investigación animal.-

c) Proponer a los respectivos Consejos de Facultad Ordenanzas y Reglamentaciones sobre la experimentación animal y la conducta de los investigadores, docentes y estudiantes, respecto de los animales de experimentación.-

d) Control, vigilancia, auditoria y supervisión respecto de los locales -biotérios, laboratorios-, y de las personas autorizadas a realizar experimentación con animales y los protocolos respectivos.-

e) Realizar visitas e inspecciones coordinadas o imprevistas, a los efectos de verificar las condiciones de los locales y de los animales sometidos a experimentación.-

f) Ejercer la potestad disciplinaria sobre todas las personas involucradas en la experimentación animal.-

g) Estudiar, proponer e instrumentar cursos de capacitación en materia de experimentación con animales, que atiendan distintos niveles, tales como: capacitación de investigadores y docentes, creación de una carrera de técnico en Bioterio, formación de estudiantes en las carreras de grado, etc.-

h) Preparar los cursos de la especialidad en experimentación animal que se exigirá a los investigadores y a todo el personal que trabaje en el área de experimentación animal, y otorgar las correspondientes acreditaciones que serán refrendadas por el Presidente de la CHEA y por el Rector.

i) Otorgar acreditaciones habilitantes para la experimentación animal, por competencia notoria, conforme a lo dispuesto por la ordenanza respectiva.-

j) Delegar en los miembros representantes de los servicios, los cometidos que faciliten las tareas de experimentación, quienes darán cuenta a la CHEA en la primera sesión ordinaria.-

Capítulo IV. Personal de los bioterios y de los laboratorios de experimentación

A.- Bioterio de producción o ciclo completo

Art. 19.- Los bioterios de producción o ciclo completo, estarán integrados por:

a) Un Director Técnico que deberá ser Veterinario o técnico en bioterio, ambos con probada experiencia en el área y con acreditación expedida por la CHEA.-

b) Un Técnico Superior o Responsable del Bioterio de producción o ciclo completo que deberá ser Veterinario con probada experiencia en el área. *Transitoriamente, el Responsable del Bioterio podrá ser un idóneo por competencia notoria bajo autorización y acreditación de la CHEA.

c) Personal Técnico que deberá haber adquirido formación en el manejo de animales mediante cursos de entrenamiento dictados a nivel nacional o internacional.

Artículo 20.- Competencias del personal superior.- Las funciones que deberá cumplir el personal mencionado en el artículo precedente son:

a) Al Director Técnico compete:

1.- Cumplir y hacer cumplir la normativa vigente.

2.- Como Jefe del Personal y encargado de las relaciones con la Administración y otros Centros, será el máximo responsable de las actividades del Centro.-

El Director Técnico debe asegurar el traslado de los animales en condiciones humanitarias e higiénicas.

b) Al Técnico Superior Responsable del Bioterio, compete:

1.- Cumplir y hacer cumplir la normativa vigente.-

2.- La responsabilidad del estado sanitario y nutricional, así como de la garantía genética de las cepas de trabajo.

3.- La planificación y vigilancia de las prácticas de saneamiento ambiental y profilaxis.-

4.- La adquisición de animales, el diseño de locales y la coordinación de las actividades de todo el personal.

5.- Recepcionar y ejecutar los pedidos de animales para los distintos trabajos de investigación posteriormente a la aprobación por parte de la CHEA del trabajo de experimentación.

6.- Programar los sistemas de cría, manejo y selección de reproductores.

7.- Programar el número de animales que deberá mantener en las distintas áreas de cada especie y cepa de trabajo, de acuerdo a las solicitudes presentadas por los investigadores.

8.- Organizar y administrar las actividades del Bioterio.

9.- Proponer a la CHEA normas de funcionamiento y manejo del Bioterio, quien las elevará al Consejo de la Facultad, para su consideración y posterior aprobación por el Consejo Directivo Central.-

10.- Definir las áreas de uso común para los investigadores y las áreas reservadas para el personal a cargo del Bioterio.

11.- Asesorará sobre la manipulación de los animales utilizados por investigadores o los docentes.

12.- Supervisar el correcto manejo de los animales por parte de los investigadores o los docentes.

13.- Formar al personal a su cargo, mediante docencia directa o a través de la participación de cursos nacionales, regionales o internacionales. c) Al Personal Técnico, compete:

Dar cumplimiento a las instrucciones impartidas por el personal superior.-

B.- Laboratorio de experimentación

Artículo 21.- Integración.-

Los laboratorios de experimentación estarán integrados por:

a) Un responsable, que deberá ser investigador con experiencia en la disciplina.

b) Personal Técnico que deberá haber adquirido entrenamiento en el manejo de animales mediante cursos de capacitación dictados a nivel nacional o internacional.

Artículo 22.- Competencias.-

El personal de los laboratorios posee las siguientes competencias:

A) Al responsable del laboratorio de experimentación, le compete:

- 1.- Cumplir y hacer cumplir la normativa vigente.
- 2.- Supervisar el correcto manejo de los animales por parte de los investigadores.
- 3.- Asesorar en la manipulación de los animales en el trabajo experimental de los distintos investigadores.
- 4.- Determinar el destino último de los animales, una vez finalizado el trabajo de experimentación.

B) Al personal técnico compete:

Dar cumplimiento a las funciones impartidas por el Responsable del laboratorio de experimentación.

Capítulo V. De los usuarios de los bioterios y laboratorios de experimentación

Artículo 23. Definición.- Serán usuarios de los bioterios y laboratorios de experimentación todos los Investigadores o Docentes acreditados en experimentación animal.-

Artículo 24.- Solicitudes.- Los usuarios deberán presentar la solicitud ante la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA), en formulario especialmente preparado al respecto, detallando el trabajo a realizar.-

Artículo 25.- Informe de la CHEA.- Estudiada la solicitud conforme a la normativa vigente la CHEA, elevará un informe vinculante al Consejo de la Facultad respectiva, quien resolverá, en definitiva.-

Artículo 26.- Formulario de solicitud.- Para la experimentación con animales en Investigación o Docencia, el usuario deberá completar en un formulario:

- 1.- Los beneficios que se pretenden obtener con la experimentación.-
- 2.- Los criterios utilizados para seleccionar adecuadamente la especie y calidad sanitaria, así como el número mínimo necesario a utilizar para obtener resultados científicamente válidos.
- 3.- Las precauciones necesarias para evitar o minimizar toda molestia, intranquilidad o dolor de la especie seleccionada.

4.- El método seleccionado para sacrificar al animal, en caso de que ello resulte necesario.-

Artículo 27.- Responsabilidad.- Tanto los usuarios, como el personal de los Bioterios serán responsables:

- a) del cumplimiento de las normas de bioseguridad de acuerdo con la normativa vigente que asegure la protección de la salud humana; y
- b) destino último de los animales de experimentación, de manera de asegurar las condiciones de bioseguridad adecuadas.

Artículo 28.- Obligaciones de los usuarios.- Constituyen obligaciones de los usuarios:

- a) planificar y comunicar por escrito al responsable del Bioterio con suficiente antelación: la especie, cepa, número y edad de los animales a utilizar;
- b) coordinar con el responsable, los requerimientos necesarios en cuanto a alojamiento y alimentación de los animales, equipamiento, personal encargado del mantenimiento, limpieza y destino último de los animales y
- c) coordinar con el responsable, las medidas necesarias para atender en forma correcta a los animales durante el lapso en que no se experimenta.

Artículo 29.- Responsabilidad por las personas supervisadas.- Los investigadores y docentes serán directamente responsables de las personas que supervisen en cuanto

a que las mismas cumplan con la normativa establecida hasta su acreditación.

Capítulo VI.

Acreditación por competencia notoria

Artículo 30.- Los investigadores o docentes que, a la fecha de vigencia de esta Ordenanza, hayan trabajado con animales con fines de experimentación, docencia o investigación, podrán obtener la acreditación de experto en la materia, por competencia notoria.

Se entiende por Competencia Notoria la capacitación en una disciplina determinada, por la actuación profesional destacada en la docencia, en la investigación y en el conocimiento de los diversos medios y técnicas de la especialidad, así como en la continuidad en que ha cumplido el trabajo.

Para acceder a la acreditación, se deberá cumplir con los requisitos establecidos por la ordenanza respectiva.

Anexo II.

Ley n.º 18.611. Utilización de Animales en Actividades de Experimentación, Docencia e Investigación Científica

El Senado y la Cámara de Representantes de la República Oriental del Uruguay, reunidos en Asamblea General,

Decretan

Capítulo I. De las disposiciones preliminares

Artículo 1º.- La cría y la utilización de animales en actividades de experimentación, docencia e investigación científica en todo el territorio nacional se regirá por las disposiciones de esta ley.

Artículo 2º.- Son consideradas como actividades de experimentación e investigación científica todas aquellas relacionadas con las ciencias básicas, ciencias aplicadas, desarrollo tecnológico y biotecnológico, producción y control de la calidad de drogas, medicamentos, alimentos, inmunobiológicos, dispositivos e instrumentos.

No son consideradas como actividades de investigación las prácticas relacionadas con:

A) La producción animal, tales como el anillado, el tatuaje, la marcación o la aplicación de otro método con finalidad de identificación del animal, que cause dolor leve o aflicción momentánea o daño pasajero y las intervenciones no-experimentales relacionadas a la misma.

B) La salud animal, tales como la profilaxis y el tratamiento veterinario.

La utilización de animales en actividades educativas queda restringida a establecimientos de enseñanza secundaria y terciaria, públicos y privados, e instituciones donde se desarrolle investigación científica.

Artículo 3º.- Los animales alcanzados por esta ley son las especies clasificadas dentro del filo Chordata, subfilo Vertebrata.

Se entiende por *filo Chordata* animales que poseen, como características exclusivas, al menos en la fase embrionaria, la presencia de notocorda, hendiduras branquiales en la faringe y tubo neural dorsal único; y por subfilo Vertebrata, animales cordados que tienen como características exclusivas un encéfalo contenido dentro de una caja craneana y una columna vertebral.

Capítulo II. De la Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA)

Artículo 4º.- Créase la Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA).

Artículo 5º.- La CNEA será presidida por el Ministro de Educación y Cultura o por quien este designe, quien tendrá doble voto en caso de empate.

Será integrada además por un representante titular y un alterno de cada órgano y entidad:

A) Ministerio de Educación y Cultura. B) Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. C) Ministerio de Salud Pública. D) Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente. E) Universidad de la República. F) Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII). G) Asociación Uruguaya de Ciencia y Tecnología de Animales de Laboratorio. H) Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay. I) Sociedad Uruguaya de Biociencias. J) Un representante de la Cámara de Industrias (de especialidades farmacéuticas y veterinarias) designado por el Poder Ejecutivo a propuesta de estas. K) Un representante de las Sociedades Protectoras de Animales legalmente constituidas en el país, designado por el Poder Ejecutivo a propuesta de estas.

Artículo 6º.- La CNEA designará comisiones permanentes y temporarias y contará con una secretaria ejecutiva

responsable de la gestión administrativa. Los cometidos e integración de las comisiones permanentes y temporarias serán regulados por el reglamento interno de la CNEA. Los recursos humanos y materiales necesarios para su funcionamiento serán de cargo del Ministerio de Educación y Cultura.

Artículo 7°.- Los miembros de la CNEA tendrán carácter honorario y su mandato durará cuatro años.

Artículo 8°.- Compete a la CNEA:

A) Formular y garantizar el cumplimiento de las normas relativas a la utilización y transporte humanitario de animales con finalidades de experimentación, docencia e investigación científica.

B) Asesorar al Poder Ejecutivo al respecto de las actividades reguladas por esta ley.

C) Implementar el sistema nacional de acreditaciones personales dirigido a todo aquel que utilice animales en experimentación, docencia e investigación científica, llevando un registro de estas.

D) Mantener un registro actualizado de las instituciones para cría, utilización o transporte de animales en experimentación, docencia e investigación científica.

E) Mantener un registro actualizado de los procedimientos de experimentación, docencia e investigación científica en el país, a partir de informaciones remitidas por las Comisiones de Ética en el Uso de Animales, creadas por el artículo 9° de la presente ley.

F) Establecer y rever, periódicamente, las normas para uso y cuidados con animales para experimentación, docencia e investigación científica, en consonancia con las convenciones internacionales a las cuales la República Oriental del Uruguay esté suscrita.

G) Establecer y rever, periódicamente, normas técnicas para instalación y funcionamiento de centros de cría, bio-terios y laboratorios de experimentación animal, así como sobre las condiciones de trabajo en tales instalaciones.

H) Establecer y rever, periódicamente, los requisitos necesarios para que las instituciones y su personal, que utilicen animales para experimentación, docencia e investigación científica, se inscriban o mantengan su inscripción en el sistema nacional de acreditaciones y en el registro creado en los literales C) y D), respectivamente.

I) Aplicar sanciones.

J) Elaborar y someter su reglamento interno al Ministerio de Educación y Cultura, para su aprobación.

Capítulo III. De las comisiones de ética en el uso de animales

Artículo 9°.- Las instituciones que desarrollen actividades de experimentación, docencia e investigación científica con animales deberán constituir previamente a su registro (literal D) del artículo 8° de la presente ley) la Comisión de Ética en el Uso de Animales.

Artículo 10.- La Comisión de Ética en el Uso de Animales estará integrada al menos por:

- Un médico veterinario.

- Un docente o investigador.

- Un representante de la comunidad local. Los mismos están obligados a guardar la confidencialidad de los procedimientos bajo pena de responsabilidad.

Artículo 11.- Compete a la Comisión de Ética en el Uso de Animales:

A) Cumplir y hacer cumplir las disposiciones legales -en sentido amplio- aplicables a la utilización de animales para experimentación, docencia e investigación científica.

B) Examinar los procedimientos de experimentación, docencia e investigación científica a ser realizados en la institución a la cual se encuentra vinculada, para asesorar y determinar su compatibilidad y viabilidad con la legislación vigente.

C) Llevar un registro de los procedimientos de experimentación, docencia e investigación científica de la institución que asesora, mantenerlo actualizado y elevarlo anualmente a la CNEA.

D) Llevar y mantener actualizado un registro del personal acreditado por la CNEA para el uso de animales en procedimientos de experimentación, docencia e investigación científica de la institución que asesora.

E) Promover el sistema nacional de acreditaciones entre el personal que usa animales en procedimientos de experimentación, docencia e investigación científica de la institución que asesora.

F) Expedir, en el ámbito de sus atribuciones, los certificados necesarios para presentar ante órganos de financiación de investigación, revistas científicas u otros.

G) Ordenar la detención de las actividades de experimentación, docencia e investigación científica de la institución, una vez constatado cualquier incumplimiento de las disposiciones legales, hasta que la irregularidad sea saneada, sin perjuicio de la aplicación de otras sanciones.

Capítulo IV.

De las condiciones de cría y uso de animales para enseñanza e investigación científica

Artículo 12.- La cría, la utilización y el transporte de animales para experimentación, docencia e investigación quedan reservados, exclusivamente, a las instituciones registradas ante la CNEA.

Artículo 13.- Toda institución que críe, utilice o transporte animales para experimentación, docencia e investigación debe registrarse ante la CNEA. También deberá estar registrada toda persona que trabaje con animales en las mismas.

Artículo 14.- El animal solamente podrá ser sometido a las intervenciones recomendadas en los protocolos de

experimentación, docencia e investigación cuando antes, durante y después del experimento, recibiera los cuidados especiales, conforme a lo establecido por la CNEA.

Se entiende por experimento a los procedimientos efectuados en animales vivos, buscando la elucidación de fenómenos fisiológicos o patológicos, mediante técnicas específicas y pre-establecidas; y por muerte por medios humanitarios o eutanasia, a la muerte de un animal en condiciones (diferentes según las especies) que involucren un mínimo de sufrimiento.

Artículo 15.- Los experimentos que puedan causar dolor o distrés deberán desarrollarse bajo sedación, analgesia o anestesia adecuadas, salvo cuando su objetivo lo impida, en cuyo caso deberá ser debidamente justificado.

Queda vedado el uso de bloqueantes neuromusculares o de relajantes musculares en sustitución de sustancias sedantes, analgésicas o anestésicas.

Queda vedada la reutilización del mismo animal después de alcanzado el objetivo principal del proyecto de investigación salvo excepciones debidamente fundadas.

El animal será sometido a eutanasia, bajo estricta obediencia de las prescripciones pertinentes a cada especie, conforme a las directrices de la CNEA, siempre que, culminado el experimento o en cualquiera de sus fases, fuera técnicamente recomendado aquel procedimiento o cuando ocurriera intenso sufrimiento.

Artículo 16.- En programas de docencia:

A) Siempre que sea posible, las prácticas docentes deberán ser fotografiadas, filmadas o grabadas, de forma de permitir su reproducción para ilustración de prácticas futuras, evitándose la repetición innecesaria de procedimientos didácticos con el empleo directo de animales.

B) Siempre que fuesen empleados procedimientos traumáticos, varios procedimientos podrán ser realizados en un mismo animal, considerando que todos sean ejecutados durante la vigencia de un único anestésico y que el animal sea sacrificado antes de recobrar la conciencia.

Artículo 17.- El número de animales a ser utilizados para la ejecución de un proyecto de experimentación, docencia o investigación y el tiempo de duración de cada experimento será el mínimo indispensable para producir un resultado concluyente.

Capítulo V.

De las penalidades

Artículo 18.- La fiscalización de las actividades reguladas por esta ley estará a cargo de los órganos de los Ministerios de Educación y Cultura, de Ganadería, Agricultura y Pesca, de Salud Pública y de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, en las áreas de sus respectivas competencias.

Artículo 19.- Una vez que los organismos de contralor precedentemente mencionados constaten una infracción a la ley se pondrá la misma en conocimiento de la CNEA,

quien previo cumplimiento del debido proceso, impondrá la sanción que corresponda.

Artículo 20.- Las instituciones a que refiere esta ley estarán sujetas, en caso de su trasgresión, a las siguientes sanciones administrativas:

A) Advertencia

B) Multa de 100 a 500 UR (cien a quinientas unidades reajustables).

C) Suspensión temporal de las actividades vinculadas a la experimentación, docencia e investigación animal, que no podrá exceder los 30 (treinta) días.

D) Clausura. Todo ello sin perjuicio de las sanciones penales o civiles que puedan corresponder.

Artículo 21.- Toda persona que viole las disposiciones de la presente ley será pasible de las siguientes sanciones administrativas:

A) Advertencia.

B) Inhabilitación temporal de la acreditación personal para realizar actividades de experimentación, docencia e investigación.

C) Suspensión de financiamientos provenientes de fuentes de financiación y fomento científico.

D) Inhabilitación definitiva para el ejercicio de las actividades reguladas en esta ley. Todo ello sin perjuicio de las

sanciones penales o civiles que puedan corresponder, así como aquellas resultantes de los reglamentos de las instituciones a las que pertenezcan.

Artículo 22.- Las sanciones previstas en los artículos precedentes serán aplicadas por la CNEA de acuerdo con la gravedad de la infracción, los daños que de ella deriven, las circunstancias agravantes o atenuantes y los antecedentes del infractor.

Cuando se trate de la clausura o la inhabilitación definitiva la sanción deberá ser homologada por el Ministerio de Educación y Cultura.

Capítulo VI. Disposiciones transitorias

Artículo 23.- El Poder Ejecutivo reglamentará la presente ley en el plazo de 180 (ciento ochenta) días a partir de su promulgación.

Artículo 24.- Las instituciones que crían, utilizan o transportan animales para la experimentación, docencia o investigación dispondrán, para adecuarse a las disposiciones de esta ley y su reglamentación, de un plazo máximo de 90 (noventa) días, a partir de esta última.

Sala de Sesiones de la Cámara de Representantes, en Montevideo, a 15 de setiembre de 2009.

Roque Arregui, Presidente.

José Pedro Montero, Secretario.

Ministerio de Educación y Cultura; Ministerio de Industria, Energía y Minería; Ministerio de Salud Pública; Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca; Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente.

Montevideo, 2 de octubre de 2009.

Cumplase, acúcese recibo, comuníquese, publíquese e insértese en el Registro Nacional de Leyes y Decretos, la Ley por la que se disponen procedimientos para la utilización de animales en actividades de experimentación, docencia e investigación científica.

Tabaré Vázquez; María Simon; Raúl Sendic; María Julia Muñoz; Andrés Berterreche; Carlos Colacce.³

³ Fuente:
<http://www.parlamento.gub.uy/leyes/ AccesoTextoLey.asp?Ley=18611>
<https://www.cnea.gub.uy>

Anexo III. Tablas

Capítulo IV. Animales más utilizados

Tabla 1: Espacio recomendado para mantener a los animales de laboratorio (adaptado de Zúñiga, 2001)

Especie	Peso corporal	Área piso/animal	Altura (cm) (a)
Ratón (*)	< 10 g	38,70 cm ²	15
	10-15 g	51,60 cm ²	
	16-25 g	77,40 cm ²	
	> 25 g (b)	96,8 cm ²	
Rata (*)	< 100 g	109,7 cm ²	17,8
	100-200 g	148,4 cm ²	
	201-300 g	187 cm ²	
	301-400 g	258 cm ²	
	401-500 g	387 cm ²	
	> 500 g (b)	451,7 cm ²	
Cobayo (*)	< 350 g	387 cm ²	17,8
	> 350 g	651,6 cm ²	
Conejo	< 2 kg	0,1400 cm ²	35,7
	2-4 kg	0,2790 cm ²	
	4,1-5,4 kg	0,3720 cm ²	
	> 5,4 kg	0,4650 cm ²	

(*): animales alojados en grupo; (a): de piso a techo de la jaula; (b): los animales más grandes pueden requerir mayor espacio

Tabla 2: Ejemplo de código de marcado con ácido pícrico al 1,6 % utilizado en el Laboratorio de Experimentación Animal de Fac. de Química, Universidad de la República

Número	Marca
1	Sin marca
2	Cabeza
3	Lomo
4	Base de la cola
5	Pata delantera derecha
6	Pata delantera izquierda
7	Pata trasera derecha
8	Pata trasera izquierda
9	Patas delanteras
10	Patas traseras

Capítulo V. Vías de administración y toma de muestras

Para determinar el volumen de dosis a administrar se debe tener en cuenta el menor volumen posible para minimizar cualquier angustia o problema de bienestar y no debe producir cambios fisiológicos o patológicos que comprometan el experimento; cuanto menor sea el volumen mejor.

En cuanto a los datos de la tabla 3:

- *Intravenosa*: se refiere a la inyección del inóculo en un período relativamente corto de tiempo (aproximadamente 1 min).
- *Subcutánea*: el volumen depende de la flacidez de la piel del animal y con ello del potencial espacio subcutáneo. Para la administración de volúmenes mayores se deberá utilizar múltiples puntos de inoculación, si la aplicación es diaria se debe aplicar en un máximo de cuatro puntos. Estos volúmenes son para inoculaciones sin adyuvante de Freund, para el uso de este adyuvante ver datos en tablas 6 y 7.

- *Intradérmica*: el volumen depende del espesor y la piel que varía con el lugar y la especie, el máximo número de puntos de administración: 6.
- *Intramuscular*: el volumen indicado es para un único punto de administración

Tabla 3: Volúmenes recomendables a administrar y tamaño de aguja, según especie (adaptado de: Training Manual Series, AALAS y Laboratory Animals (2001), 35: 1-40)

Especie	Intravenosa (+)	Intraperitoneal	Intramuscular	Subcutánea
Ratón			NR	
	Vena lateral de la cola		Cuádriceps, muslo posterior	Cuello
	0,2 ml	2-3 ml	0,05 ml	2-3 ml
	26-28 G	25-27 G	27 G	25 G
Rata			NR	
	Vena lateral de la cola		Cuádriceps, muslo posterior	Cuello
	0,5 ml	5-10 ml	0,3 ml	5-10 ml
	25-27 G	23-25 Gg	25 G	25 G
Cobayo	Vena de oreja, vena safena		Cuádriceps, muslo posterior	Cuello
	0,5 ml	10-15 ml	0,3 ml	5-10 ml
	25-27 G	23-25 G	25 G	23-25 G
Conejo	Vena marginal de la oreja		Cuádriceps, muslo posterior, músculo lumbar	Cuello, flancos
	1-5 ml (lento)	50-100 ml	0,5 ml	30-50 ml
	23-25 G	21-23 G	25 G	21-25 G

NR: No Recomendado

(+): El volumen máximo debe ser normalmente del 4 % y nunca mayor al 5 % del volumen de sangre circulante

Al extraer sangre, tener en cuenta:

- Conocer perfectamente anatomía de la especie
- Importancia de la velocidad de extracción (rápido colapso de vena)
- Anticoagulantes (Heparina 5 a 10 UI/ml; Citrato una parte de de sodio 3.8 % y tres partes de sangre)
- Stress (¿uso de anestésicos?)
- Qué hacer cuando hay problemas
- Volumen de sangre a extraer

Shock hipovolémico:	Extracción rápida o repetida sin reposición
Volemia:	% del peso corporal
Tamaño muestreo máximo:	
10 % Volemia:	Se puede repetir cada 3 o 4 semanas aproximadamente
15 a 20 % Volemia:	disminuye el gasto cardíaco y la presión sanguínea
30 a 40 % Volemia:	shock hemorrágico
> 40 % Volemia:	causa mortalidad del 50 % en ratas
Muestras Repetidas:	terapia de reemplazo con fluidos (subcutáneo) a 37 °C; 1 % volemia cada 24 hs. (< 24 hs. o > 1 %, produce anemia).

Se debe reemplazar el mismo volumen que se extrae.

Shock Hipovolémico:

- Pulso rápido y débil
- Mucosas secas y pálidas
- Piel y extremidades frías
- Intranquilidad
- Hiperventilación
- Temperatura corporal anormal

Anemia:

Palidez de membranas mucosas y conjuntiva

- Palidez interior de la boca, encías y lengua
- Palidez en orejas
- Palidez en almohadillas plantares (no pigmentados)
- Intolerancia al ejercicio
- Ritmo respiratorio incrementado en reposo

Tabla 4: Ejemplo de volúmenes aproximados de sangre e intervalos entre colectas (adaptado de National Research Council)

Peso del animal (gr)	Volumen de Sangre Circulante (ml)	1% (ml) a extraer cada 24 hs	10 % (ml) a extraer cada dos semanas
20	1,10 - 1,40	0,011 - 0,014	0,11 - 0,14
25	1,37 - 1,75	0,014 - 0,018	0,14 - 0,18
30	1,65 - 2,10	0,017 - 0,021	0,17 - 0,21
35	1,93 - 2,45	0,019 - 0,025	0,19 - 0,25
40	2,20 - 2,80	0,022 - 0,028	0,22 - 0,28
125	6,88 - 8,75	0,069 - 0,088	0,69 - 0,88
150	8,25 - 10,50	0,082 - 0,105	0,82 - 1,0
200	11,0 - 14,0	0,11 - 0,14	1,1 - 1,4
250	13,75 - 17,50	0,14 - 0,18	1,4 - 1,8
300	16,50 - 21,0	0,17 - 0,21	1,7 - 2,1
350	19,25 - 24,50	0,19 - 0,25	1,9 - 2,5

Tabla 5: Volúmenes máximos tolerables de administración (adaptado de Procedimiento de Administración de Sustancias, POE Pontificia Universidad Javeriana, Colombia)

Especie	Vía y volumen (mg/Kg)					
	Oral	SC	IP	IM	IV (bolo)	IV (lento)
Ratón	50	40	80	0,1	5	25
Rata	40	10	20	0,2	5	25

Tabla 6: Inmunización en ratones

Vía	Volumen máximo	Adyuvante	Requerimiento inmunógeno	Siguientes dosis
Subcutánea (SC)	50-100 µl	+/-	Soluble o insoluble	SC
Intramuscular (IM)	No recomendada	-	-	-
Intradérmica (ID)	No recomendada	-	-	-
Intravenosa (IV)	200 µl. Se recomienda para el <i>booster</i> final antes de fusión para obtener hibridoma.	No	Soluble	-
Intraperitoneal (IP)	500 µl	+/-	Soluble o insoluble	SC

Tabla 7: Inmunización en conejos

Vía	Volumen máximo	Adyuvante	Requerimiento inmunógeno	Dosis subsiguientes
Subcutánea (SC)	80 µl/sitio; 10 sitios por conejo	+/-	Soluble o insoluble	SC, IM
Intramuscular (IM)	0,5 ml	+/-	Soluble o insoluble	SC, IM
Intradérmica (ID)	100 µl/sitio; 40 sitios por conejo	+/-	Soluble o insoluble	SC, IM
Intravenosa (IV)	1 ml en la vena marginal de la oreja	No	Soluble.	SC, IM

Capítulo VII. Analgesia y anestesia

Tabla 8: Indicadores de dolor en animales de laboratorio (Carsten 2000; Rivera 2009)

Especie	Comportamiento general	Apariencia	Fisiología
Rata	Reducción de actividad exploratoria	Piloerección	Sueño interrumpido
	Vocalizaciones	Postura anormal, encorvada	Hipotermia
	Reducción de apetito e ingesta de líquidos	Porfirina en los ojos	Respiración rápida y superficial
	Lame y protege extremidades	Párpados parcialmente cerrados	Puede gruñir al expirar
	Automutilación	Pupilas dilatadas	Pérdida de peso y deshidratación
	Aumento de agresión y vocalización	Secreción nasal	
	Aversión hacia los conespecíficos		
Ratón	Similar a la rata	Similar a la rata	Similar a la rata
	Aumento de movimiento de las vibrizas	No hay secreción de porfirina en los ojos	
Cobayo	Vocalizaciones (chillidos)	Similar a la rata	Similar a la rata
	Tienden a aislarse		
	Pelo erizado		
	Estampidas cuando se manipulan o muy tranquilos		
	Ojos «hundidos» o apagados		
Conejo	Ansioso	Puede que no muestre cambios	Salivación aumentada
	Se esconde		Respiración rápida y superficial
	Vocalizaciones (chillidos)		
	Agresivo (patea o muerde)		
	Perdida de apetito		
	Canibaliza a conejos jóvenes		
	Inmovilidad tónica (aparentan estar adormecidos)		

Tabla 9 : Anestesia y analgesia en ratones (adaptada de Regueiro-Puriños, 2013; Remie 2016)

Agente	Dosis	Duración
Anestesia		
Pentobarbital	50 mg/kg IP	
Metomidato/Fentanil	60 mg/kg + 0,06 mg/kg SC	20-40 min
Ketamina/Xilaxina	80-100 mg/kg + 10 mg/kg IP	20-30 min
Ketamina/ Medetodimina	80-100 mg/kg + 10 mg/kg IP	20-30 min
Analgesia		
Buprenorfina	0.05-0.1 mg/kg SC	
Butorfanol	1-5 mg/kg SC	
Combinaciones anestésicas		
Ketamina + medetomidina	60-75 mg/kg + 0,4-0,5 mg/kg IM, intraperitoneal, SC	Anestesia quirúrgica, 20-180 min; poliuria, hipotermia
Ketamina + xilazina	40-100 mg/kg + 5-10 mg/kg IM, intraperitoneal	Anestesia quirúrgica, 20-30 min; recuperaciones largas
Ketamina + diazepam	40-80 mg/kg + 5-10 mg/kg intraperitoneal	Alta seguridad
Pentobarbital	40-50 mg/kg intraperitoneal	Breve duración anestesia; estrecho margen de seguridad
Isoflurano	Inducción, 2-4 %; mantenimiento, 1,5-3 %	Buena inducción y recuperación, poca excitación
Sevoflurano	Inducción, 6-8 %; mantenimiento, 3-3,5 %	Buena inducción y recuperación, poca excitación

IM: intramuscular; IV: intravenoso; SC: subcutáneo.

Tabla 10: Anestesia y analgesia en ratas (adaptada de Regueiro-Puriños, 2013; Remie 2016)

Agente	Dosis	Duración y Observaciones
Anestesia		
Pentobarbital	40-50 mg/kg IP	Breve duración anestesia; estrecho margen de seguridad
Ketamina/ Medetomidina	60-75 mg/kg + 0,4-0,5 mg/kg IM, IP, SC	Anestesia quirúrgica, 20-180 min
Ketamina/Diazepam	40-80 mg/kg + 5-10 mg/kg IP	Alta seguridad
Ketamina/Xilacina	40-100 mg/kg + 5-10 mg/kg IM, IP	Anestesia quirúrgica 20-30 minutos, recuperación larga
Isoflurano	Inducción, 2-4%; mantenimiento, 1,5-3%	Buena inducción y recuperación, poca excitación
Sevoflurano	Inducción, 6-8%; mantenimiento, 3-3,5%	Buena inducción y recuperación, poca excitación
Sedante		
Acepromacina	1-2,5 mg/kg IM, IP, SC	Sedación, pero continúan activos
Diazepam	2,5 mg/kg IM, IP, IV	solo sedación
Midazolán	2,5 mg/kg IM, IP, IV	solo sedación
Medetodimina	30-100 mg/kg IP, SC	Sedación y algo de analgesia, inmovilización a dosis altas
Xilacina	1,5 mg/kg IP; 5 mg/kg IM, SC	Sedación y algo de analgesia, inmovilización a dosis altas
Analgesia		
Buprenorfina	0,01-0,05 mg/kg IM, IP, SC; 0,1-0,25 mg/kg oral; 0,01-0,02 mg/ml agua bebida	cada 8-12 h
	0,1-0,25 mg/kg VO	
Butorfanol	2 mg/kg SC c/4 h	
Morfina	2,5 mg/kg IM, SC	cada 4 hs
Fentanilo	0,01-0,3 mg/kg SC	2-4 h

Tabla 11: Anestesia y analgesia en conejos (adaptado de Regueiro-Puriños 2013; Remie 2016)

Agente	Dosis	Duración de anestesia quirúrgica
Anestesia		
Ketamina	25-50 mg/kg IM	Hipnosis de moderada a profunda y leve analgesia
Ketamina/Xilacina	35 mg/kg IM+ 5 mg/kg IM	25-40 min
Pentobarbital	Inducción con 10 mg/kg IV y administrar en incrementos de 2 a 10 mg hasta obtener un nivel satisfactorio de anestesia	20-30 min
Tiopental	30 mg/kg IV	Anestesia quirúrgica 5-10 min; tiempo de despertar, 10-15 min
Propofol	10 mg/kg IV / 0,5-1,5 mg/kg/min	Anestesia ligera 5-10 min; apnea común a dosis altas; recuperación rápida y tranquila; tiempo de despertar, 10-15 min
Isoflurano	Inducción 2 -5 %; mantenimiento 1,25-2,5%	Cuidado si se usa para inducción: apnea, acidosis, hipercapnia, bradicardia; malo como agente único; controlar presión arterial
Sedante		
Acepromazina	0,1-0,5 mg/kg IM	sedación moderada a leve, produce vasodilatación periférica
Midazolam	2 mg/kg IM, IV	sedación moderada a profunda
Diazepam	1-2 mg/kg IM, IV	sedación moderada a profunda
Medetomidina	0,1-0,3 mg/kg IM, SC	Sedación ligera a profunda
Xilacina	5 mg/kg IM	Sedación ligera a profunda
Analgesia		
Morfina	2-4 mg/kg SC	efecto 4 h
Buprenorfina	0,02-0,05 mg/kg SC o IV	analgesia moderada, adm c/8-12 h
Fentanilo	0,005-0,04 mg/kg IV bolo	Analgesia intraquirúrgica, efecto aprox. 30-40 min

Tabla 12: Anestesia y analgesia en cobayos (adaptado de Remie 2016)

Agente	Dosis	Duración de anestesia quirúrgica
Anestesia		
Ketamina/Xilacina	30 mg/kg + 5 mg/kg IM	30-45 minutos
	44 mg/kg + 5 mg/kg IM	74 minutes
Pentobarbital	15 mg/kg IP	60 minutes
Fentanilo	0,4 ml/kg IM	60 minutes
Analgesia		
Morfina	2-5 mg/kg SC c/4 h	
Buprenorfina	0,05 mg/kg SC	
Indometacina	2,5 -8,8 mg/kg VO	

Capítulo VIII. Métodos de eutanasia

Tabla 13: Clasificación de métodos de eutanasia

	Métodos físicos	Métodos farmacológicos	
Aceptables	Disparo	Agentes inhalatorios:	Dióxido de carbono
	Bala / Perno cautivo		Monóxido de carbono
	Concusión		agentes inhalatorios
	Dislocación cervical	Animales Acuáticos (diluidos e agua):	Benzocaína
	Decapitación		MS-222
	Maceración		Etomidato y Metomidato
	Irradiación con microondas	Agentes inyectables:	Barbitúricos
	T-61		
Condicionamente aceptables	Aturdimiento eléctrico		
	Inserción de aguja	Hidrato de Cloral	
	Congelación rápida	Cloruro de Potasio	
	Esanguinación	Embolia gaseosa	
	Nitrogeno/Argón		
Inaceptables	Descompresión / vacío	Eter	
	Hipotermia	Cloroformo	
	Hipertermia	Metoxiflurano	
	Ahogamiento	Bloqueantes neuromusculares	
	Estrangulación	Sulfato de Magnesio	

Tabla 14: Métodos de eutanasia en roedores (adaptado de European Commission, 1997)

Agente	Rapidez	Eficacia	Facilidad de uso	Seguridad para operador	Valor estético	Calificación general	Comentarios
Halotano, enflurano, isoflurano	++	++	++	+	++	5	Aceptable
Pentobarbital	++	++	++	+	++	5	Aceptable
Concusión	++	++	+	++	-	4	Aceptable para roedores < 1 kg. La muerte debe ser confirmada
Dislocación cervical	++	++	+	++	-	4	Aceptable para roedores < 250 g. La muerte debe ser confirmada
T-61	++	++	-	+	++	4	Solo puede ser por vía intravenosa
Dióxido de carbono	+	++	++	++	+	4	Aceptable a > 70%
Microondas	++	++	-	++	+	3	Solo personal especializado, <i>no</i> como método de rutina
Decapitación	+	+	+	++	-	2	Es preferible utilizar otros métodos
Monóxido de carbono	+	+	+	++	-	2	Peligroso para el operador
Congelamiento rápido	-	+	++	++	+	1	Únicamente en neonatos < 4 g
Exanguinación						1	Condicionamente aceptables (únicamente con el animal inconsciente)
Cloruro de potasio						1	
Embolia gaseosa						1	
Congelamiento rápido (animales > 4 g)						1	

Tabla 14: continuación

Agente	Rapidez	Eficacia	Facilidad de uso	Seguridad para operador	Valor estético	Calificación general	Comentarios
Hipotermia	-	-	-	-	-	0	No aceptables
Descompresión	-	-	-	-	-	0	
Asfixia / Ahogamiento	-	-	-	-	-	0	
Nitrógeno / Argón	-	-	-	-	-	0	
Óxido Nitroso	-	-	-	-	-	0	
Ciclopropano	-	-	-	-	-	0	
Éter / Cloroformo	-	-	-	-	-	0	
Metoxifluorano	-	-	-	-	-	0	
Hidrato de cloral	-	-	-	-	-	0	
Bloqueantes neurovasculares	-	-	-	-	-	0	

Rapidez: ++ muy rápido, + rápido, - lento. Eficacia: ++ muy efectivo, + efectivo, - no efectivo. Facilidad de Uso: ++ fácil de usar, + requiere experiencia, - requiere entrenamiento especializado. Seguridad para Operador: ++ no peligroso, + poco peligroso, - peligroso. Valor Estético: ++ estéticamente bueno, + aceptable para la mayoría, - no aceptable. Calificación General: de 1 a 5 donde 5 es altamente recomendable

ISBN: 978-9974-0-2060-3



9 789974 020603



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

COMISIÓN HONORARIA DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL
COMISIÓN SECTORIAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA