

Libros de **Cátedra**

Ciencia y Bienestar de los Animales de Laboratorio

Cecilia Carbone, Miguel Ángel Ayala
y María del Pilar Cagliada (coordinadores)

n
naturales

FACULTAD DE
CIENCIAS VETERINARIAS


EDITORIAL DE LA UNLP



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

CIENCIA Y BIENESTAR DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO

Cecilia Carbone
Miguel Ángel Ayala
María del Pilar Cagliada
(coordinadores)

Facultad de Ciencias Veterinarias



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA


Edulp
EDITORIAL DE LA UNLP

A todos aquellos que respetan, valoran y aman a los animales.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de La Plata por habernos dado la oportunidad de publicar esta obra; a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP y a la Cátedra de Animales de Laboratorio y Bioterio, lugar donde aprendimos y seguimos aprendiendo la ciencia de los animales de laboratorio; a nuestros maestros por sembrar en cada uno de nosotros la curiosidad y el entusiasmo; a todos nuestros colaboradores y alumnos por habernos incentivado a continuar mejorando y motivado para emprender la aventura de escribir este libro; a Ana Manasanch por sus consejos y presencia incondicional, a nuestras familias y amigos por ayudarnos a sobrellevar las dificultades y a sostener el entusiasmo mediante su compañía, comprensión y cariño.

La ética no es otra cosa que la reverencia por la vida. Ello me brinda mi principio fundamental de moralidad, a saber, que el bien consiste en mantener, ayudar y mejorar la vida y el mal en destruirla, dañarla u obstaculizarla

Albert Schweitzer, CIVILIZATION AND ETHICS. 1923

Índice

Introducción	9
Capítulo 1	
Antecedentes históricos	11
<i>Silvana Nora Milocco</i>	
Capítulo 2	
Estándares internacionales. Legislación. CICUAL.....	20
<i>Cecilia Carbone y Miguel Ángel Ayala</i>	
Capítulo 3	
Educación y entrenamiento del personal	28
<i>Cecilia Carbone</i>	
Capítulo 4	
Bienestar en animales de experimentación	33
<i>Agustina Resasco</i>	
Capítulo 5	
Diseño y planificación de bioterios	46
<i>Fabrizio Maschi y Estela Cora Rogers</i>	
Capítulo 6	
Estandarización de las condiciones ambientales y de alojamiento. Macro y microambiente	60
<i>Silvana Nora Milocco y María del Pilar Cagliada</i>	
Capítulo 7	
Calidad genética.....	78
<i>Silvana Nora Milocco</i>	

Capítulo 8

Calidad sanitaria de ratas y ratones de experimentación 93

Cecilia Carbone y Miguel Ángel Ayala

Capítulo 9

Enfermedades infecciosas de pequeños roedores de experimentación 99

Miguel Ángel Ayala

Capítulo 10

Control sanitario de los animales de laboratorio 119

Juan Martín Laborde

Capítulo 11

El ratón como animal de experimentación 128

Miguel Ángel Ayala

Capítulo 12

La rata como animal de experimentación 142

María del Pilar Cagliada

Capítulo 13

El hámster como animal de experimentación 158

Juan Martín Laborde

Capítulo 14

El jerbo como animal de experimentación 167

Juan Martín Laborde

Capítulo 15

El cobayo como animal de experimentación 180

Martín Carriquiriborde

Capítulo 16

El conejo como animal de experimentación 188

Martín Carriquiriborde

Capítulo 17

El perro y el gato como animales de experimentación 196

Ana C. Carranza Martín

Capítulo 18	
El cerdo como animal de experimentación	206
<i>Guido Mariano Principi</i>	
Capítulo 19	
Peces como animales de experimentación.....	217
<i>Juan Martín Laborde</i>	
Capítulo 20	
Transporte de los animales de experimentación	229
<i>Miguel Ángel Ayala</i>	
Capítulo 21	
Analgésia, anestesia y eutanasia en animales de experimentación.....	235
<i>María Clara Vercellini y Guido Mariano Principi</i>	
Capítulo 22	
Modelos animales	253
<i>Fabrizio Maschi</i>	
Capítulo 23	
Diseño experimental.....	260
<i>Alicia Graciela Antonini</i>	
Capítulo 24	
Gestión de bioterios	269
<i>Fabrizio Maschi y Pilar Cagliada</i>	
Capítulo 25	
Gestión de calidad en bioterios	279
<i>Fabrizio Maschi y Claudia García Bonelli</i>	
Los autores	287

Introducción

El uso de animales de laboratorio constituye una parte muy importante de las investigaciones biomédicas. Las personas que las llevan a cabo tienen responsabilidades muy amplias que incluyen, entre otras, la gestión de las instalaciones para animales, el cumplimiento de normas y estándares internacionales y la ejecución de procedimientos técnicos y científicos relacionados con los proyectos de investigación o controles de calidad.

El presente libro abarca los contenidos básicos relacionados con la ciencia y el bienestar de los animales de laboratorio. Es la intención de quienes lo elaboramos el brindar a estudiantes y profesionales una herramienta en idioma español en la que estén presentes los contenidos principales de esta ciencia.

El libro está organizado en capítulos, los temas que se abordan inicialmente intentan aportar los lineamientos generales necesarios para desarrollar aquellos trabajos en los que se incluyan animales de experimentación. En este sentido, los antecedentes históricos muestran el camino recorrido por parte de científicos e investigadores y los hallazgos y descubrimientos logrados a través del tiempo; mientras que el conocimiento de las normativas y estándares internacionales, muchos vinculados con aspectos morales y éticos, son orientativos respecto de las condiciones en que se deben usar y cuidar los animales en investigaciones, ensayos y docencia. Uno de los temas que se ha considerado es la necesidad y exigencia de que todo el personal relacionado con el cuidado y uso de los animales esté debidamente capacitado, por esa razón a lo largo del libro se describen los diferentes tipos de formación y entrenamiento considerados de referencia en el mundo. El lector verá que se han incluido conceptos sobre diseño y planificación de bioterios, muy necesarios para aquellos que se les presente la oportunidad de organizar y poner en marcha unidades de producción o experimentación, también sobre el micro y macroambiente en el que se mantienen los animales y las pautas para programar y llevar a cabo la producción de animales en los bioterios. Hemos querido, además, que este libro cuente con capítulos sobre calidad sanitaria y genética y bienestar animal, ya que son fundamentales para la elección del modelo animal como también para planificar y desarrollar diferentes procedimientos experimentales que favorecen la obtención de resultados precisos y confiables.

Los últimos capítulos, están focalizados en la biología y cuidados de las especies que más se utilizan en el mundo para fines científicos. Esto no significa que otras especies no puedan utilizarse o no sean importantes. Por ejemplo, peces y cerdos que son ampliamente empleados como modelos animales y sobre los cuales se incluye material. Estos contenidos son seguidos por el análisis y descripción de los métodos de analgesia, anestesia y eutanasia, esenciales

para el reconocimiento y manejo del dolor de las diferentes especies lo que permitirá cumplir con las recomendaciones internacionales. Finalmente, se tratan los temas relacionados con el diseño experimental, la gestión de bioterios, la calidad y las buenas prácticas de laboratorio. Asimismo, deseamos aclarar que para aquellos temas que no son abordados de manera exhaustiva se brindan las pautas generales y las referencias bibliográficas relacionadas que servirán al lector para profundizar en cada uno de ellos.

Finalmente, esperamos que este libro sea útil para los estudiantes, profesionales y técnicos que utilicen animales de laboratorio, y que los conceptos vertidos en este texto puedan contribuir con la precisión de los resultados de las investigaciones y ensayos como así también favorecer al bienestar de los animales que se utilizan con fines científicos a quienes los seres humanos, como parte de la naturaleza, debemos no sólo agradecer sino también respetar.

CAPÍTULO 1

Antecedentes históricos

Silvana Nora Milocco

El uso de animales como modelos experimentales de análisis de fenómenos biológicos se desarrolló junto con la humanidad.

Prehistoria

Al final del Paleolítico o paleolítico superior, 12 mil años a.C., los *Homo sapiens* evolucionaron física y mentalmente. Nuestra especie compitió con éxito sobre otras especies de humanos debido al crecimiento de su masa cerebral. La adopción de la postura erecta hizo que tuvieran las manos libres, lo que combinado al desarrollo de los pulgares oponibles hicieron posible la construcción y manipulación de herramientas y armas. El desarrollo cerebral también les permitió la creación de distintos sonidos dando lugar a la comunicación a través del lenguaje, ayudando a la cooperación entre los distintos grupos y a la organización social de los mismos (Valdebenito, 2007). Hacia finales del Paleolítico, comenzaron a expresarse artísticamente creando pequeñas esculturas y joyas. Pero lo más impresionante son las pinturas que se encuentran en las cuevas del sur de Francia y España, y en Australia, en las cuales se pueden observar los métodos de caza y una gran variedad de animales. Al abrirlos pudieron observar la disposición de sus órganos y así plasmar estos conocimientos en los dibujos, donde se puede apreciar su posición correcta. Éstos son los primeros indicios del interés del hombre sobre anatomía. Asimismo, procuraban calmar sus dolencias imitando la práctica de otras especies animales, desde despiojarse, hasta lamerse las zonas corporales afectadas; y más adelante comenzaron a utilizar plantas medicinales (Giráldez Dávila y col., 2001).

Edad Antigua

En el año 1700 a.C. en Babilonia, el Código de Hammurabi es uno de los conjuntos de leyes más antiguos y mejor conservados que existen. Sus normas, basadas en la aplicación de la ley del Talió, están talladas en piedra y, en su conjunto, son consideradas como la antesala de

algunos conceptos jurídicos modernos. Es el primer documento escrito donde se describen prácticas médicas y veterinarias.

En Egipto, se encontraron dos papiros que datan del 1600 a.C. aproximadamente, donde se distinguen el corazón, el hígado, el bazo, los riñones, el útero, la vejiga urinaria y los vasos sanguíneos. Debido a las prácticas de momificación los egipcios estaban muy familiarizados con la anatomía humana (Giráldez Dávila y col., 2001).

En Grecia, origen de la cultura occidental, surge el primer investigador en biología del que se tenga registro. Se trata de Acmaeon de Crotona, el cual demostró la función del nervio óptico seccionándolo y produciendo la ceguera de un animal, en el año 450 a.C. En los escritos de la escuela de Hipócrates, alrededor del año 300 a.C., se describe una experiencia en la que se comprueba el proceso de la deglución, seccionando la garganta de un cerdo al que se le había dado de beber agua teñida con un colorante. En esa época, se destaca la gran figura de Aristóteles (384-322 a.C.), filósofo, erudito y científico, considerado como el padre de la biología. Escribió cerca de 200 obras, y en uno de sus libros sienta las bases sobre la validez de la experimentación animal, y señala similitudes entre distintas especies, como el caballo, el perro y el hombre (Bean, 1959).

Alejandro fue el más importante centro médico, cultural y científico de la antigüedad, donde se realizaban disecciones en cadáveres humanos y animales. Herófilo (335-280 a.C.) fue el primero en hacer disecciones de cuerpos humanos junto a Erasístrato (304-250 a.C.). Posteriormente, Mitrídates VI, rey del Ponto (131-163 a.C.), temiendo ser víctima de envenenamiento ordenó a su médico Cratevas (124-164 a.C.) efectuar una serie de ensayos en animales, sobre la acción tóxica de los venenos y su protección mediante antídotos, con lo que viene a ser el iniciador de la toxicología experimental (Romero Reverón, 2008).

En el Imperio Romano, Galeno (129-216 d.C.) fue uno de los investigadores médicos más completos de la Edad Antigua. Mejoró sustancialmente las técnicas de disección, ya que las realizó en muchas especies diferentes. Debido a que esta práctica estaba prohibida en humanos, Galeno realizó experimentos en cerdos y monos removiendo varios órganos para el estudio de sus funciones. También utilizó animales para estudiar los efectos que producían las secciones de la médula espinal, las perforaciones torácicas y las ligaduras arteriales. Con este último estudio Galeno demostró que las arterias contenían sangre y no aire, hecho imposible de demostrar en animales muertos. Basándose en estudios realizados sobre el simio de Berbería, un primate similar al hombre, Galeno escribió un libro de anatomía, el cual se convirtió en un texto de referencia durante 1300 años, que, si bien fue muy útil, tenía muchas equivocaciones. Plinio el Viejo (23-79 d.C.), también se destacó y escribió libros sobre zoología, botánica, medicina y otras ciencias. Pero también formuló muchos conceptos erróneos (Moreno Rodríguez, 2013).

Edad Media

La Edad Media es un período histórico que se sitúa entre la caída del Imperio Romano en el año 476 y la caída del Imperio Bizantino en Constantinopla en 1453. Este período también es conocido como los “años oscuros” o la “edad oscura”, ya que coincide con un periodo de oscuridad, violencia e irracionalidad. A partir de la caída del Imperio Romano y a lo largo de toda la Edad Media, la actividad científica sufrió un gran estancamiento con el consecuente retraso en el conocimiento médico. En una Europa cada vez más cristianizada, las personas se preocupaban más por la vida eterna y volvieron a las creencias pre-hipocráticas sobre las causas sobrenaturales de las enfermedades y en el poder curativo de la fe. Como consecuencia, quedaron como verdades establecidas lo que habían escrito las autoridades clásicas, fundamentalmente: Hipócrates, Aristóteles, Galeno y Plinio, que se consideraron indiscutibles y definitivas. No obstante, entre los siglos XI y XIII se desarrolló al sur de Nápoles la Escuela Médica Salernitana, cuya orientación fue principalmente experimental y descriptiva. Su obra más importante fue el *Regimen Sanitatis Salernitanum* (1480), un compendio de normas higiénicas, de nutrición, de hierbas y de otras indicaciones terapéuticas. En el siglo XII se desarrollaron estudios de anatomía y la práctica de vivisecciones de animales (Franco, 2013).

La Edad Moderna

Renacimiento

Durante el Renacimiento, bajo el prisma de la filosofía humanista sustentada en el antropocentrismo y el racionalismo, los estudios científicos progresaron notablemente. El saber médico avanzó a partir de mediados del siglo XV, retomando el conocimiento del cuerpo humano como realidad básica de la medicina. El anatomista flamenco Vesalio (1514-1564), a lo largo de su trabajo como médico y cirujano, observó que muchas estructuras anatómicas que estaban presentes en animales y que se pensaba que también existían en los seres humanos, estaban ausentes. Esto lo llevó a romper las reglas civiles y religiosas establecidas y diseccionar cadáveres humanos obtenidos ilegalmente, y publicar descripciones muy precisas de la anatomía humana. Así describió las similitudes y diferencias entre la estructura interna de los humanos y otros animales, sentando las bases de la anatomía comparada moderna. Ello condujo a la investigación de las funciones de los distintos órganos y miembros, para lo cual se comenzó a practicar de nuevo la experimentación animal. Por ese entonces, se realizaron láminas sobre la anatomía del hombre y otros animales, dejando en claro la importancia de la experimentación animal para el desarrollo del conocimiento de la anatomía y la fisiología. La evidencia experimental condujo a los científicos de la época a la corrección de muchas observaciones realizadas por Galeno (García Guerrero, 2012).

Otros autores sobresalientes de la época fueron Gabriello Falopio (1523-1562) y su discípulo Fabricius de Acquapendente (1537-1619). En Inglaterra, William Harvey (1537-1657), hizo descubrimientos sobre el corazón y la circulación sanguínea, esto llevó a Richard Lower (1631-1691) a realizar la primera transfusión de sangre de perro a perro en el año 1665. Otra de las aplicaciones fue la administración de fármacos por vía intravenosa mediante un canuto de pluma de ave cortado en bisel y sujeto a una pequeña vejiga. Robert Boyle (1627-1691) construyó una campana de vacío que, al introducir en ella animales, demostró lo indispensable del aire para la vida. A partir de esto Robert Hooke (1635-1703) construyó una bomba de respiración artificial para un perro, utilizando dos balones elásticos.

René Descartes (1596-1650) sentó la teoría de que los animales y el hombre eran máquinas automáticas que obedecían a leyes mecánicas (acuñando el concepto de “reflejo”). Diferencia al humano de los animales por tener inteligencia, la cual se la atribuye al alma. Sostiene que los animales al carecer de alma son simples máquinas, y de ahí deduce que no pueden padecer verdadero dolor. La descripción de Descartes de los animales como máquinas fue duramente criticada por muchos de sus contemporáneos, sin embargo, proporcionó a los científicos una manera de justificar lo que ahora se considerarían experimentos extremadamente crueles en una época en la que no se disponía de anestesia, ni para humanos ni para animales. Sin embargo, se ha argumentado que las opiniones de Descartes sobre los animales fueron mal interpretadas, ya que no afirmó explícitamente que los animales eran incapaces de sentir dolor, e incluso había admitido que demostraban sentimientos, como el miedo, la ira, la esperanza o la alegría. No obstante, independientemente de que se haya malinterpretado o no, el maquinismo cartesiano sería evocado recurrentemente en defensa de la vivisección en los siglos XVII y XVIII. El siglo XVII también sería testigo del advenimiento del escepticismo hacia los experimentos con animales por motivos científicos. Médicos como Jean Riolan, Jr. (1580-1657) y Edmund O'Meara (1614-1681) comenzaron a cuestionar la validez de los experimentos fisiológicos llevados a cabo en animales en un estado tan alterado a causa de su sufrimiento durante la vivisección. Esta disputa entre críticos y defensores del valor científico de los modelos animales todavía resuena hoy (Greene y col., 2004).

Ilustración

En el siglo XVIII aumentaron los experimentos con animales en Europa, y comenzó un profundo debate sobre el sufrimiento infligido hacia ellos. Esta discusión se inició en Inglaterra y se extendió por toda Europa hacia finales del siglo. La oposición a la vivisección se vio impulsada por la popularización de las exhibiciones públicas de experimentos con animales vivos. A pesar de esto, en este siglo las actividades científicas de todo orden progresaron de forma excepcional y los investigadores mejoraron e intercambiaron sus informaciones dando un sentido cada vez más fundado a la interpretación de los fenómenos naturales (Álvarez Díaz, 2007).

Entre los muchos fisiólogos notables del siglo XVIII, se destacaron Stephen Hales (1677-1761), quien fue responsable de la primera medición de la presión en los vasos sanguíneos y de otros conocimientos importantes sobre la fisiología cardiovascular y respiratoria. Albrecht von Haller (1708-1777) fue posiblemente el fisiólogo más prolífico de su tiempo, conocido por sus trabajos sobre inflamación, neurofisiología, función cardíaca y hemodinamia. Si bien ambos investigadores eran conscientes del daño provocado a los animales, continuaron realizando estudios convencidos de la necesidad del uso de animales vivos para la comprensión de muchos procesos fisiológicos básicos, que aún estaban lejos de ser entendidos. Otros acontecimientos relevantes de la ciencia biomédica del siglo XVIII basados en estudios con animales incluyeron la base de la farmacología experimental, la electrofisiología y la embriología moderna. A pesar de estos avances en el conocimiento biológico, la relevancia clínica de los estudios con animales continuó siendo cuestionada (Giráldez Dávila y col., 2001).

Edad contemporánea

La Edad Contemporánea comienza con la Revolución Francesa y se extiende hasta nuestros días. Entre los siglos XVIII y XIX, se produjeron dos acontecimientos de gran importancia. Por un lado, la prevención de enfermedades mediante la inmunización de los individuos por medio de las vacunas. En 1798 el médico inglés Edward Jenner (1748-1822) logró inmunizar a las personas contra la viruela. Por otra parte, la fundación en 1790 de la Escuela de Veterinaria de Alfort (Francia) dio origen a la creación de escuelas de investigación biológica en ese país, liderando estudios en fisiología y farmacología. A principios del siglo XIX, la medicina experimentó un gran cambio, debido a que la práctica médica se enfocó en las patologías y en los procesos de las enfermedades, buscando diagnósticos y pronósticos más precisos. Este cambio de paradigma hizo que los médicos y científicos tuvieran un mayor reconocimiento ante la sociedad. Al mismo tiempo, el gran desarrollo de los ensayos en los laboratorios, proporcionó las bases para el desarrollo de la medicina del siglo XX. La *Académie Royale de Médecine*, fundada en 1820 creó un entorno próspero para las ciencias biológicas, dando mayor importancia a los ensayos con animales para responder a preguntas científicas. En la *Académie*, el objetivo de la experimentación animal se centraba en el desarrollo de nuevas terapias para distintas patologías. Hay que señalar la valiosa incorporación de los veterinarios para dichas prácticas (Franco, 2013).

Entre los científicos destacados de esta época, dos médicos sobresalieron por sus contribuciones a la fisiología experimental, François Magendie (1783-1855) y, su discípulo Claude Bernard (1813-1878). La epistemología experimental de Bernard, a diferencia del enfoque más exploratorio de su tutor, defendía que sólo los experimentos con animales controlados en forma adecuada y realizados rigurosamente, podrían proporcionar información confiable sobre fisiología y patología de relevancia médica, estableciendo el hito de la medicina experimental. Al conciliar el racionalismo de Descartes con el empirismo de Harvey, Bernard re-

conoció la importancia de las ideas y teorías para la formulación de hipótesis, salvaguardando, sin embargo, que estas sólo eran útiles si eran comprobables, y sólo creíbles si se confirmaban mediante la experimentación. Claude Bernard perfeccionó las técnicas de la vivisección, marcó conceptos tan básicos en fisiología como la homeostasis. También demostró que la digestión no se producía enteramente en el estómago, como se creía, sino también en el intestino, ello lo observó en perros, mediante fístulas a través de las cuales administraba alimentos directamente al intestino, comprobando que eran digeridos y absorbidos. Demostró que los eritrocitos transportan oxígeno a los tejidos, así como la función de los nervios vasomotores y la del glucógeno en el hígado. Describió la doble acción del páncreas, como glándula digestiva y como productor de la insulina y su relación con la diabetes. Mediante el simple experimento de ligar la arteria femoral de una rana a la que luego inyectó curare, observó que todos los músculos motores del animal quedaban paralizados, excepto los de la pata cuya irrigación había suprimido, deduciendo que el veneno transportado por la sangre debía actuar específicamente en la unión neuromuscular. En Rusia se destacó Ivan Pavlov (1849-1936) quien desarrolló las famosas experiencias de secreción salivar en perros adiestrados a reconocer señales acústicas, estableciendo la teoría de los reflejos condicionados. Asimismo, son notables sus aportes sobre el sistema digestivo, las funciones del hígado, del páncreas y del aparato cardiovascular. Desde la década de 1830 y durante la segunda mitad del siglo, el concepto de medicina científica también floreció entre un grupo distinto de fisiólogos germano prusianos, quienes estipularon que la biología podría entenderse por medio de la química y de la física, y a través de experimentos con animales. Con el uso de la microscopía, estos científicos contribuyeron enormemente al desarrollo de la anatomía, histología, patología, embriología, neurofisiología, fisiología y física (Álvarez Díaz, 2007).

Si bien la segunda mitad del siglo XIX marcó el inicio de la importancia de la investigación animal, este período también marcó la oposición a la vivisección, especialmente en Gran Bretaña. Magendie se convertiría en el gran villano del movimiento antiviviseccionista. A pesar del amplio reconocimiento de sus contribuciones a la ciencia por parte de la mayoría de sus compañeros, también fue uno de los más infames de su época por someter a los animales a torturas innecesarias. Los antiviviseccionistas y los grupos de protección animal se organizaron y en 1824 se creó la Real Sociedad para la Prevención de la Crueldad hacia los Animales (Royal Society for Prevention of Cruelty to Animals), más conocido como la RSPCA, con el propósito de dar a conocer la compasión hacia los animales, haciendo cumplir las leyes de anti crueldad existentes y aprobando otras nuevas. A medida que su membresía aumentó, la RSPCA ganó mucha influencia en Gran Bretaña. En 1857 la sociedad dirigió su atención hacia temas de experimentación animal, participando en múltiples actividades, con el fin de abolir las investigaciones en donde se provocaría dolor. Para 1870, el movimiento antiviviseccionista en Inglaterra se había convertido en un fervoroso opositor a la investigación animal. Ese mismo año, la Asociación Británica para el Avance de la Ciencia formó un comité, donde se desarrollaron lineamientos para realizar estudios fisiológicos, teniendo en consideración el sufrimiento, y para desalentar los experimentos con animales. En 1876 se promulgó la primera ley que reguló los

ensayos con animales “Ley de crueldad hacia los animales”, siendo el primer caso en el mundo. Este proyecto de ley duró 110 años, hasta la promulgación de la Ley de Animales (Procedimientos Científicos) de 1986 (Álvarez Díaz, 2007).

A medida que la idea original de los antiviviseccionistas comenzó a perder fuerza, la discusión se desplazó hacia la prevención del daño innecesario, en lugar de cuestionar el valor científico de los experimentos con animales. Por otro lado, el uso de anestésicos les permitió a los científicos británicos demostrar que la mayoría de los experimentos no producían dolor. Si bien esto hizo que algunos antiviviseccionistas reflexionaran sobre su propia posición sobre el uso de animales en la investigación, muchos otros sintieron que el valor más relevante era la preservación de la vida de cada animal en sí mismo, cuestionando si el beneficio humano era razón suficiente para sacrificar animales. El recrudecimiento y la propagación del movimiento antiviviseccionista a finales del siglo XIX, coincidió con el comienzo de los beneficios que la investigación con animales brindó a la salud (Franco, 2013).

Gracias a los trabajos de Louis Pasteur. (1822-1895) y del alemán, Robert Koch (1843-1910), quienes se basaron en gran medida en la experimentación con animales, se dilucidó que las enfermedades infecciosas eran causadas por agentes patógenos o microbios. Este conocimiento tendría un efecto inmediato, profundo y duradero en la salud pública, la cirugía y la medicina. Paul Erlich (1854-1919) estudió la meningitis y la sífilis, promoviendo valiosos adelantos en histología. También formuló su famosa teoría de la “llave y la cerradura” relacionada a la inmunidad, que lo acredita como indiscutible promotor de la inmunología (Giraldez Dávila y col., 2001).

A finales del siglo XIX y principios del XX, la farmacopea contaba con preparados eficaces y probados científicamente, hecho que permitió que un número cada vez mayor de personas comprendiera la importancia y validez del conocimiento médico científicamente sólido y, con ello, la relevancia de la investigación basada en animales. La medicina en sí y la salud humana se modificaron de manera irreversible, y seguirían avanzando a lo largo del siglo XX hasta la actualidad (Franco, 2013).

El siglo XX fue testigo de asombrosos avances en el conocimiento médico y el tratamiento de enfermedades. El descubrimiento de las vitaminas, hormonas, antibióticos, la transfusión de sangre en forma segura, las nuevas vacunas, la hemodiálisis, la quimioterapia y la radioterapia para el cáncer, la erradicación de la viruela (y la casi erradicación de la poliomielitis), los avances en el diagnóstico y las nuevas técnicas quirúrgicas son unos pocos ejemplos de los logros médicos del siglo XX, que no solo han salvado millones de vidas humanas y animales, sino que también aliviaron el sufrimiento inducido por diferentes enfermedades. Los avances de la investigación biomédica para la salud humana desde los albores del siglo pasado son innumerables, y la investigación animal desempeña un papel en una serie de descubrimientos importantes. De los 110 premios Nobel de fisiología o medicina otorgados desde 1901, aproximadamente el 80% de los trabajos fueron realizados con vertebrados. Otra medida indirecta del impacto que tuvo el progreso biomédico en

el siglo XX fue el aumento de la esperanza de vida, que en algunos países desarrollados se duplicó entre 1900 y 2000, y sigue aumentando en la actualidad (Franco, 2013).

En la década de 1910-1920, los grupos antiviviseccionistas continuaron ejerciendo presión para que se regulen las investigaciones con animales y así evitar el sufrimiento de los mismos. Pero debido a la grave recesión económica del año 30, y a las dos guerras mundiales, este movimiento perdió el apoyo del público en general y de los grupos de protección animal más moderados, lo que llevaría a un declive, aunque no a un final, del movimiento antiviviseccionista, hasta su resurgimiento en la década de 1970. La línea de acción durante la mayor parte del siglo XX se centró sobre la prohibición del uso de perros y otros animales de compañía. Otro factor que atenuó la oposición al uso de animales, está relacionado con el surgimiento de las cepas de ratones y ratas como modelos animales. A diferencia de los perros o los caballos, estos roedores eran vistos como criaturas despreciables por la mayoría del público y, por lo tanto, menos dignos de contemplación moral, lo que a su vez consideraba más aceptable su uso en la investigación (Franco, 2013).

Las ratas domésticas (*Rattus norvegicus*) fueron las primeras especies de roedores que se utilizaron con fines científicos. Su uso en la investigación fisiológica se remonta a 1828, pero solo en las primeras décadas del siglo XX se convirtieron en una herramienta preferida en la investigación, después del desarrollo en 1909 de la primera cepa estándar, la Wistar, de la cual descienden la mitad de las ratas utilizadas en los laboratorios en la actualidad. El ratón (*Mus musculus*) también había sido utilizado en el siglo XIX, por Gregor Mendel en sus estudios de la década de 1850 sobre la herencia del color del pelaje, hasta que el obispo local censuró la cría de ratones como inapropiada para un sacerdote, lo que le hizo recurrir al uso de guisantes. Lucien Cuénot (1866-1951) volvería a utilizar al ratón para demostrar que los mamíferos también poseían genes y que seguían las leyes de la herencia mendeliana. Desde entonces se convirtió en el modelo ideal para estudios de genética, campo que creció exponencialmente tras el descubrimiento de la estructura del ADN en 1953 por James Watson (nacido en 1928) y Francis Crick (1916-2004). En 1980, John Gordon y Franck Ruddle desarrollaron el primer ratón transgénico. En el 2002, se secuenció todo su genoma. Estas, junto con otras tecnologías, han abierto posibilidades ilimitadas para la comprensión de la función de los genes y su influencia en varias enfermedades genéticas y no genéticas, y han convertido al ratón en el modelo animal más utilizado en nuestros días, con la perspectiva de que seguirá teniendo un papel central en biomedicina (Franco, 2013).

Referencias

- Álvarez-Díaz JA. (2007) La controversia sobre la vivisección. *Acta bioethica*. 13 (1) 53-60.
- Bean W. (1959) A short history of anatomy from the Greeks to Harvey. *AMA Arch Intern Med*. 104 (4):677-678.

- Franco N. (2013) Animal Experiments in Biomedical Research: A Historical Perspective. *Animals (Basel)*. 3 (1): 238–273.
- García Guerrero M. (2012) Medicina y arte. La revolución de la anatomía en el Renacimiento. *Revista Científica de la Sociedad Española de Enfermería Neurológica*. Junio (0) 25-27.
- Giráldez Dávila A. y Zúñiga J. (2001) La ciencia del animal de laboratorio. Jesús Zúñiga, Ramón Piñeiro González, Silvana Milocco y Josep Tur Marí (Eds.) *Libro Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal* (3-22). Madrid McGraw-Hill Interamericana.
- Grene M.G., Depew D.J. (2004) Descartes, Harvey, and the emergence of modern mechanism. *Libro: The Philosophy of Biology: An Episodic History*. Cambridge University Press; Cambridge, UK: 35-63.
- Moreno Rodríguez R. (2013) Ética y medicina en la obra de Galeno. *Dynamis* 33 (2): 441-460.
- Romero Reverón RM. (2008) Erasistratus de Ceos (310-250 A.C.). Pionero de los Estudios Anatómicos. *Int. J. Morphol.* 26 (4):823-824.
- Valdebenito C. (2007) Definiendo homo sapiens-sapiens: aproximación antropológica. *Acta Bioethica* 2007; 13 (1) 71-78.

CAPÍTULO 2

Estándares internacionales. Legislación. CICUAL

Cecilia Carbone y Miguel Ángel Ayala

El cuidado, manejo y uso de los animales de experimentación está regulado en la mayoría de los países. Ahora bien ¿Por qué razón surgió la necesidad de reglamentar las actividades relacionadas con los animales de laboratorio?, en primer lugar debemos decir que a las personas se les presenta un conflicto ético cuando utilizan seres vivos en investigaciones, pruebas, ensayos y en docencia, teniendo en cuenta que los animales son seres que no pueden dar su consentimiento para que los sometan a procedimientos, ni decidir por sí mismos y son comparables a personas incapacitadas para hacerlo, por ejemplo niños o adultos incompetentes cognitivamente.

Hasta el año 1789, en el cual el filósofo, economista, pensador y escritor inglés Jeremy Bentham enuncia que no se trata de preguntar si los animales pueden razonar sino de cuestionar si pueden sufrir, ya que estos se consideraban hasta ese momento como seres no sufrientes. El cambio que produce Bentham al precisar que los animales sufren y que su bienestar es relevante se contrapone a los pensamientos del filósofo francés Rene Descartes que asevera que los animales no sienten y son autómatas. Es así que, en occidente, desde el año 1790 se comienza a hablar y discutir sobre la sensibilidad de los animales, cómo los tratan las personas y de qué manera los considera la sociedad. A pesar de ello no es sino hasta 1964 en que la británica Ruth Harrison publica *Animal Machines*, donde expone una dura crítica a los métodos utilizados para la cría y manejo de los animales de producción en Gran Bretaña en esos momentos. Esto generó un reclamo por parte de la sociedad que hizo visible la situación y provocó cambios.

El interés por los animales y los conflictos éticos y morales en referencia a su utilización, condujo a la formulación de principios para su cuidado, manejo y uso.

Estos principios están contenidos en documentos de referencia y se los denomina estándares internacionales para el cuidado, manejo y uso de los animales que se utilizan con fines científicos.

Dichos documentos de referencia fueron generados por organismos internacionales, como CIOMS (Consejo Internacional de Organizaciones de Ciencias Médicas), ICLAS (Consejo Internacional para la Ciencia de Animales de Laboratorio), OIE- WOAHA (Organización Mundial de Sanidad Animal), y otros por diferentes organizaciones pertenecientes a países o regiones como los desarrollados por FELASA, (Federación Europea de Asociaciones de Animales de

Laboratorio), de la Unión Europea, CCAC (Consejo Canadiense para el Cuidado Animal), The National Academies, USA y algunos pertenecientes a organismos y asociaciones de diferentes países como AVMA (Asociación Americana de Veterinaria) e ILAR (Instituto para la investigación con Animales de laboratorio).

Estos documentos de referencia contienen principios generales (CIOMS, ICLAS) que establecen que:

- El uso de animales en la investigación, enseñanza y pruebas, es aceptable solamente si contribuye en forma efectiva a la mejor comprensión de principios biológicos fundamentales, o al desarrollo de conocimientos que, razonablemente, podemos esperar que beneficien a los seres humanos o a los animales.
- Los animales deberían usarse únicamente cuando el investigador haya buscado sin éxito encontrar una alternativa aceptable. Si se deben utilizar animales, ellos deberían mantenerse en condiciones que aseguren su bienestar físico y emocional.
- Los animales no se deben someter a angustia o dolor innecesarios. La técnica experimental debe asegurarles toda la protección posible, ya sea para investigación, enseñanza o para pruebas; el costo y la conveniencia no deben tener precedencia sobre el bienestar físico y mental del animal.

Otros tratan temas específicos, sin embargo, en todos los casos comparten la importancia de preceptos fundamentales que se deben considerar para el cuidado y uso de animales de experimentación:

- Respetar el principio de las 3 Rs
- Justificación del uso de animales en la investigación o ensayo
- Uso de las especies, calidad y número apropiados de animales.
- Evitar o reducir al mínimo la incomodidad, distrés y dolor
- Uso apropiado de sedación, analgesia y anestesia.
- Determinar el punto final humanitario en los experimentos.
- Brindar un manejo apropiado a los animales dirigido y realizado por personas debidamente entrenadas.
- Conducir experimentos con animales vivos solo bajo la supervisión de personas calificadas.

Principio de las 3Rs

WMS Russell (1925-2006) y RL Burch (1926-1996) originaron y fueron los autores de conceptos de reemplazo, reducción y refinamiento, que publicaron en su libro en el año 1959 *The Principles of Humane Experimental Techniques*.

El objetivo de Russell y Burch era mejorar el trato hacia los animales de experimentación al tiempo que se avanzaba en la calidad de las investigaciones y pruebas científicas. Desde entonces, los principios rectores que sustentan el uso humanitario de los animales en la investi-

gación científica se denominan las tres Rs. Estos principios muestran una estrategia racional para reducir el número de animales utilizados y disminuir el sufrimiento ocasionado, sin comprometer la calidad científica del trabajo realizado y teniendo como objetivo final la sustitución total de los modelos animales por técnicas alternativas (3rcenter.dk)

Cualquier investigador que planea utilizar animales en su investigación debe primero demostrar por qué no hay alternativa y qué se hará para minimizar el número y el sufrimiento en los procedimientos, implementando el principio de las 3 Rs, (Mortell y col. 2009) es decir:

- *Reemplazar* el uso de animales con técnicas alternativas o evitar el uso de animales por completo. Se refiere a la sustitución del uso de animales vivos por métodos o modelos alternativos por ejemplo técnicas in vitro, modelos computarizados, cultivos celulares y otros. El ensayo o el procedimiento que se realiza con un método alternativo deben obtener el mismo resultado que si se realizara con seres vivos. Estos métodos alternativos deben estar validados
- *Reducir* al mínimo el número de animales utilizados y que al mismo tiempo permitan obtener resultados confiables y precisos. La disminución del número de animales en un ensayo dependerá de la elección de modelos animales adecuados, de un control exhaustivo de los factores ambientales, de la condición sanitaria de los animales
- *Refinar* y perfeccionar la forma en que se llevan a cabo los experimentos, para asegurar de que los animales sufran lo menos posible. Esto incluye mejores alojamientos y la optimización de los métodos y procedimientos para minimizar el dolor, el estrés y el sufrimiento, los efectos adversos sufridos por los animales implicados y mejorar el bienestar animal (Hubrecht y col. 2019).

Justificación del uso de animales en la investigación o ensayo

Se refiere a la evaluación del costo beneficio de la investigación o ensayo. El costo es el grado de incomodidad, estrés o dolor que el procedimiento que se emplee le provocará al animal y el beneficio a los objetivos que deben ser científicamente claros y a los resultados que siempre deben beneficiar a la salud o bienestar de las personas, animales o favorecer al medio ambiente.

Uso de las especies, calidad y número apropiado de animales

La elección del modelo animal adecuado a la experiencia es fundamental para obtener resultados confiables y comparables. Esto incluye la calidad sanitaria y genética y el empleo de métodos estadísticos para que el tamaño de la muestra sea el correcto. En esta instancia se aplica el principio de reducción de las 3Rs

Evitar o reducir al mínimo la incomodidad, distrés y dolor y uso apropiado de sedación, analgesia y anestesia.

Es una condición indispensable que el personal usuario investigador y técnico conozcan las características y necesidades de la especie con la que trabajan, las manifestaciones de dolor, incomodidad o estrés y que siempre cuenten con un médico veterinario que se ocupe del manejo del dolor (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 2011)

Determinar el punto final humanitario en los experimentos

El punto final humanitario (PFH) es el criterio por el cual se decide que los animales dejen de sufrir. El objetivo es minimizar y aliviar el sufrimiento animal.

Se pueden identificar cinco tipos o situaciones de punto final. El primer tipo es cuando un animal no proporciona información científica válida debido a que sus parámetros fisiológicos se ven afectados, por ejemplo, un animal que desarrolla en mitad de la experiencia una diarrea profusa por lo cual se considera un modelo metabólico inestable e incapaz de brindar resultados confiables. El segundo tipo es cuando un animal está afectado mentalmente debido no solo al confinamiento sino también como consecuencia de procedimientos experimentales; por ejemplo, administración de sustancias o toma de muestras que en ocasiones son dificultosas, en estas situaciones el metabolismo y especialmente el sistema inmunitario se ve afectado por lo que deja de ser un modelo adecuado. El tercer tipo de punto final es cuando el sufrimiento que se le ocasiona al animal durante la experiencia supera lo previsto produciéndose un desbalance entre el costo vs beneficio, es decir que el daño que se le causa a al animal es mayor que el beneficio que se ha planteado como objetivo. El cuarto caso es cuando el daño y sufrimiento que se le provoca al animal es extremo, y por esta razón se lo considera un error, se denomina daño o angustia severa y el quinto se refiere a la situación en la que se le provoca un alto grado de sufrimiento al animal y que está justificado, pero no hay necesidad de llegar a un punto extremo por poder lograr predecir un resultado científico válido a un nivel pre letal o pre dolor; se llama punto final sustitutivo. Por ejemplo, en investigaciones sobre diabetes no esperar la muerte del animal sino detectar niveles de glucosa en sangre para terminar la prueba.

El PFH, no siempre se implementa a través de la eutanasia del animal, en ocasiones, en que el sufrimiento es mayor del previsto, se puede modificar o reforzar la terapia con analgésicos. Otra situación es finalizar la experiencia sin necesidad de practicar la eutanasia a los animales, simplemente al interrumpir el procedimiento los animales dejan de sufrir.

Es importante saber reconocer cuando el bienestar de los animales está comprometido. Para ello es fundamental el entrenamiento y conocimiento del personal vinculado a la especie animal que se utilice e implementar el refinamiento de las técnicas que se empleen. Una forma eficaz y práctica es el uso de hojas de valoración en las que se enumeren los signos clínicos a observar, estas son muy útiles para realizar el control de los animales luego de someterlos a un procedimiento.

Brindar un manejo apropiado a los animales dirigido y realizado por personas debidamente entrenadas y conducir experimentos con animales vivos solo bajo la supervisión de personas calificadas.

Es indispensable que todo el personal vinculado al trabajo con animales esté debidamente entrenado. Tanto el Investigador principal, responsable del proyecto e integrantes del mismo como los técnicos encargados del cuidado de los animales y demás auxiliares relacionados con los procedimientos deben acreditar una formación en ciencia de animales de laboratorio acorde con las características del trabajo que vayan a realizar.

Indudablemente el cumplimiento de los estándares internacionales no solo protege el bienestar de los animales de experimentación sino también mejoran y optimizan los resultados que se obtengan. Además, permiten cumplir con las exigencias para la publicación de trabajos científicos en revistas de jerarquía, por lo cual se deberá incluir determinada información acerca de los animales que se utilizaron, los procedimientos y las técnicas empleadas. Esto está descrito en varios documentos de referencia internacional, uno de ellos es la guía ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments, en inglés), otro es The Gold Standard Publication Checklist (GSPC) y la guía PREPARE: guidelines for planning animal research and testing. Sucede que, para un investigador usuario de animales de laboratorio, le será imposible cumplir con esta exigencia a menos que haya respetado y trabajado de acuerdo con los estándares internacionales.

Legislación

Para el correcto desarrollo de las actividades relacionadas con la ciencia de los animales de laboratorio resulta imprescindible contar con un marco legal que establezca estándares y recomendaciones sobre el cuidado y el bienestar de los animales utilizados para fines científicos.

A nivel internacional, los países desarrollados trabajan con animales de experimentación bajo lo establecido por leyes que protegen a los animales utilizados con fines científicos y también a las personas que trabajan con los mismos. En algunos de ellos las leyes datan desde hace más de cien años.

En el caso de América del Sur, son dos los países que cuentan con una ley específica para la protección, cuidado y uso de animales de experimentación, este es el caso de Uruguay y Brasil. Sin embargo, hay en otros países como en Colombia y Chile leyes dentro de las cuales se incluyen artículos referidos al cuidado y uso de animales de experimentación.

En nuestro país no contamos con una ley específica para la protección y el bienestar de los animales utilizados en investigaciones, pruebas y en docencia. Sin duda esta situación perjudica las actividades en las que se usan animales comprometiendo muchas veces su bienestar. Además, afecta negativamente la implementación de los estándares internacionales y en consecuencia la confiabilidad de los trabajos en los que se usan modelos animales.

La ley vigente en Argentina es la 14346 de *Malos tratos y actos de crueldad a los animales*, sancionada el 27 de septiembre de 1954, conocida como Ley Sarmiento (Ley Nacional 14.346, 1954)

Es en verdad una ley cuyo texto debe modernizarse, en este sentido en el año 2018 se comenzó a debatir su actualización en la Cámara Baja poniendo énfasis en la protección de los animales, pero excluyendo aquellos que se destinan a fines científicos. En el mes de julio de 2019 el plenario de las Comisiones de Legislación General y de Legislación Penal de la Cámara de Diputados aprobó el dictamen que busca modificar la Ley 14.346 de maltrato animal.

El dictamen al que se arribó incluye los delitos contra la vida y la integridad animal; un régimen de maltrato y crueldad; la prohibición de utilizar animales de cualquier especie en espectáculos circenses y la prohibición de mutilaciones por estética.

Esta es en verdad una ley que data de momentos en que no se habían establecido principios fundamentales que hoy integran los estándares internacionales como el principio de las 3 Rs, por lo cual es inaplicable a los animales de laboratorio.

En nuestro país también están vigentes dos normativas:

La Disposición 6344/96 de ANMAT del año 1996 (ANMAT. Disposición N° 5318/2010)

para bioterios de laboratorios elaboradores de especialidades medicinales y/o de análisis para terceros y la Resolución SENASA 617/02 del año 2002 (Resolución 617/2002 SENASA), para la habilitación técnica de laboratorios que posean bioterios de producción, mantenimiento y local de experimentación.

Ambas están destinadas a sectores específicos relacionados con la realización de ensayos y elaboración de especialidades farmacéuticas para uso en medicina humana y veterinaria.

En los últimos años, a partir de un proyecto de la entonces AADEAL (Asociación Argentina de Experimentación con Animales de laboratorio) que fue aprobado por la Cámara de Diputados de la Nación en el año 1996, pero que luego no prosperó; la AACyTAL (Asociación Argentina de Ciencia y Tecnología de Animales de laboratorio), convocó una serie de expertos para elaborar un anteproyecto para la protección y el bienestar de los animales usados con fines científicos. En el año 2012 fue revisado y respaldado a través de talleres en los cuales participaron representantes de los organismos nacionales y privados del país. Asimismo, letrados especializados analizaron el proyecto, se obtuvo el apoyo del Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación Productiva a través del Sistema Nacional de Bioterios y contando con el Diputado Echegaray para la presentación ante la Cámara Baja se obtuvo la media sanción por parte de la Honorable Cámara de Diputados de la Nación en noviembre de 2017.

Lamentablemente, debido a diversos factores como la presión de grupos animalistas, presentación de otros proyectos similares y disidencias entre legisladores, el proyecto perdió estado parlamentario en diciembre de 2018. Actualmente la AACyTAL está trabajando para volver a presentarlo.

Comités Institucionales para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio o Experimentación

Los Comités Institucionales para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio o Experimentación (CICUAL o CICUAE), se han creado para ser el órgano responsable de supervisar el programa de cuidado y uso de animales destinados a fines científicos de la institución a la cual pertenecen (OLAW NIH/IACUC).

En el caso de los Estados Unidos de América, es obligatoria la existencia de un CICUAL (IACUC), en inglés) ya que, en su legislación, se deposita gran parte de las responsabilidades y funciones en estas comisiones.

En Latinoamérica gran parte de las instituciones en las que se utilizan animales de experimentación, han conformado y puesto en funcionamiento CICUALes. En los países en los cuales no existe un marco regulatorio, como en Argentina, la creación y actividad de estos comités han contribuido con la implementación de los estándares internacionales y mejorado el bienestar animal además de despertar la necesidad de contar con un programa de cuidado y uso de animales. Por otra parte, los CICUALes permiten jerarquizar a la institución de pertenencia y dar respuesta a las exigencias que emanan de la sociedad.

La responsabilidades de los CICUALes se centran en: la revisión y evaluación del programa de la institución para el cuidado, uso y bienestar de los animales; la inspección de las instalaciones destinadas al alojamiento de los mismos; hacer recomendaciones sobre cambios y mejoras necesarios para asegurar el bienestar de los animales, incluida la formación del personal; revisar y aprobar cambios de procedimientos que estén en curso, evaluar el cumplimiento de los mismos a través de seguimientos y generar informes sobre las actividades del comité.

En cuanto a sus integrantes, los CICUALes deben ser multidisciplinarios, cada institución establece su propia conformación. Sin embargo se recomienda que al menos esté integrado por: un veterinario con formación o experiencia en ciencia y medicina de animales de laboratorio, que tenga autoridad y responsabilidad directa o delegada en las actividades relacionadas con animales en la institución; un profesional científico con experiencia en el uso de animales de laboratorio, un miembros cuyo interés no esté centrado en actividades científicas (eticista, estadista, filósofo) y un miembro externo no afiliado a la institución.

Las propuestas las evalúa el CICUAL a través de un protocolo que debe presentar la persona responsable de la investigación, ensayo, procedimiento o actividad docente. El mismo debe contener información suficiente y clara sobre el proyecto de acuerdo con la exigencia de cada institución.

Referencias

ANMAT. Disposición N° 5318/2010

Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. <https://www.boe.es/doue/2010/276/L00033-00079.pdf>

Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 8th. Edition. The National Academies Press 2011

Hubrecht, R; Carter, Ethe 3Rs and Humane Experimental Technique: Implementing Change.

Animals 2019, 9(10), 754; <https://doi.org/10.3390/ani9100754>

Ley Nacional 14.346 de Malos tratos y actos de crueldad a los animales

Mortell, N. The 3Rs revisited. *Lab Anim* **38**, 353 (2009). <https://doi.org/10.1038/labani1109-353>

Resolución 617/2002 SENASA

<https://olaw.nih.gov/resources/tutorial/iacuc.htm>

<https://en.3rcenter.dk/3r/russell-burch/>

<https://ccac.ca/en/three-rs-and-ethics/>

CAPÍTULO 3

Educación y entrenamiento del personal

Cecilia Carbone

Los estándares internacionales focalizan su atención y toman como un tema de especial relevancia la formación del personal científico y técnico vinculado al cuidado y uso de los animales de experimentación.

En los países que tienen una ley específica para la protección y bienestar de los animales de laboratorio, la educación del personal constituye una exigencia y un requisito a cumplir sin el cual no se habilita a las personas para trabajar y utilizar animales con fines científicos.

Hay que tener en cuenta que los organismos de administración y financiación de la ciencia y la tecnología para otorgar subsidios a proyectos, los CICUALes para la aprobación de protocolos y las revistas científicas para la publicación de trabajos exigen que todo el personal relacionado con los animales: el investigador usuario y el técnico cuidador de animales de experimentación tengan las competencias acordes con las funciones que vayan a desempeñar. Esto garantiza el bienestar de los animales usados en investigaciones, ensayos y docencia además de contribuir con la calidad y los resultados de investigaciones y pruebas en las que se utilizan animales de experimentación.

Un ejemplo de lo que establece una ley o normativa en referencia a este tema es la Directiva 2010/63/UE del parlamento y del consejo europeo del 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos que establece en sus considerandos que el bienestar de los animales utilizados en procedimientos científicos depende en gran medida de la calidad y competencia profesional del personal que supervisa los procedimientos, así como de quienes los realizan o supervisan a los que cuidan diariamente de los animales. Determina que los estados miembros deben garantizar, por medio de autorizaciones u otros medios, que el personal esté debidamente formado e instruido y que sea competente, lo cual ratifica en su art 23 (Directiva /63/UE 2010)

Asimismo, en el art.24 exige que los estados miembros de la UE velaran porque todos los bioterios de producción y de experimentación y usuarios dispongan de personas que sean responsables de: la supervisión del bienestar y cuidado de los animales, que estén adecuadamente formadas y de manera continua y que estén capacitados para determinar la finalización de una experiencia en la cual se le esté provocando sufrimiento, dolor, angustia o daño duradero a un animal.

Para cumplir con esta directiva, la Federación Europea de Asociaciones de Ciencia de Animales de Laboratorio (FELASA, en inglés) ha elaborado un programa para la formación del personal vinculado al trabajo con animales de experimentación que funciona en la UE desde 1995. Establece cuatro categorías: A, B, C y D (FELASA 1995)

Categoría A, personal cuidador: que cuida y mantiene animales

Categoría B, personal técnico experimentador: que diseña y lleva a cabo procedimientos experimentales

Categoría C, personal investigador: que diseña, planifica y dirige procedimientos experimentales

Categoría D, personal especialista en ciencia y bienestar de animales de experimentación: que supervisa y salvaguarda el bienestar animal

Las categorías A y D incluyen a profesionales que trabajan con animales de experimentación, tienen una formación larga que combina educación, entrenamiento y experiencia.

Las categorías B y C son las que están integradas por profesionales de diversas áreas del conocimiento. Es una formación corta en el tiempo, en general mediante cursos de iniciación que permitan acreditarse para el uso de animales

En el caso de la categoría A, cuidadores, se clasifican en diferentes niveles del 0 sin experiencia, hasta el 2 con un mínimo de 3 años de experiencia.

Los contenidos de los cursos que acreditan para categoría A y B están detallados en los programas de FELASA y se imparten generalmente en escuelas de formación profesional, centros de investigación y en las empresas que entrenan a su propio personal.

La formación de profesionales de categorías C y D se dicta en universidades como cursos de posgrado. En el caso de la categoría D, equivale a una especialidad por su carga horaria y requisitos. A la educación de la categoría C acceden estudiantes de doctorado, profesionales para trabajar en empresas, ya que es una exigencia y licenciados interesados en acreditarse. Es importante mencionar que la legislación europea limita el acceso a esta categoría a profesionales con formación biológica.

En el año 2018, el Grupo de trabajo de expertos de la UE recomendó que las personas que realizan una de las funciones A, B, C o D durante las cuales existe la posibilidad de provocar dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero a un animal, deben haber completado la formación pertinente antes de trabajar bajo supervisión. En otros casos, se permite que el aprendiz comience a trabajar bajo vigilancia de un experto antes de que haya completado satisfactoriamente los módulos relevantes. La responsabilidad del correcto desempeño de las tareas se centra en la figura del supervisor, esto es hasta que se haya completado la capacitación y demostrado la competencia requerida. (FELASA 2018)

Estos requisitos se reflejan en diferentes enfoques destinados a la evaluación de la formación satisfactoria y del logro de la competencia. El esquema de acreditación de FELASA aborda desde los primeros pasos el proceso educativo- adquisición de conocimientos y habilidades básicas- que concluye con un examen que asegura el reconocimiento internacional de este programa como referente de alta calidad.

En la UE existe el grado de Diplomatura para los profesionales veterinarios, esto es cuando un veterinario que haya obtenido la categoría D que sumado a la capacidad del profesional sobre cuidado veterinario puede obtener la Diplomatura del ECLAM, en inglés, *European College of Laboratory Animal Medicine* (Colegio Europeo de Medicina de Animales de Laboratorio). Para diplomarse ECLAM se requiere: un mínimo de cuatro años de experiencia; 1 o 2 años de trabajo bajo supervisión de un Diplomado ECLAM; 2 publicaciones científicas originales y un examen, para convertirse en un médico veterinario especialista en medicina de animales de laboratorio.

En los Estados Unidos de América existen tres categorías para la formación de técnicos para el cuidado y uso de animales de laboratorio que ofrece la Asociación Americana de Ciencia de Animales de Laboratorio (AALAS, en inglés), en orden de jerarquía: ALAT (Assistant Laboratory Animal Technician), LAT (Laboratory Animal Technician) y LATG (Laboratory Animal Technologist).(aalas.org 2018)

ALAT: corresponde a un curso de 40 semanas diseñado para técnicos en animales de laboratorio que deseen prepararse para obtener la certificación como ALAT El contenido del curso incluye:

Salud bienestar y cría de animales, Anatomía y fisiología de especies, producción, manejo, apareamientos, nutrición, práctica de manejo de las colonias, prevención y control de enfermedades, clínica, salud y procedimientos, ética y bienestar animal, escritura y lectura.

LAT: Programa de 20 semanas diseñado para técnicos en AL que quieran prepararse para la certificación como LAT. El contenido del programa incluye el material de ALAT sumado al de LAT. Es decir, que se van incorporando competencias, ya que el aspirante a esta categoría de técnico debe haber obtenido su grado de ALAT o formación equivalente.

LATG: este grado corresponde a tecnólogos. Es un programa de 24 semanas diseñado para personas que hayan alcanzado el grado de ALAT y LAT o formación equivalente y aspiren a alcanzar la certificación de LATG.

Es importante mencionar que para trabajar como técnica o técnico en bioterios de los Estados Unidos de América se exige la certificación de alguna de estas tres categorías. Las personas con formación empírica no son aceptadas para cumplir con estas funciones.

En Canadá, existe una organización a nivel nacional denominada Consejo Canadiense para el Cuidado de Animales (CCAC, en inglés) surgió en los años 1960 a 1970 como un pedido del Consejo Nacional de Investigaciones de Canadá para dar lineamientos y programas destinados a fomentar una actitud ética frente al uso de animales de experimentación y su bienestar (Griffin 2009)

El CCAC ha dispuesto que cada institución en Canadá se ocupará y será responsable de la formación del personal técnico y científico de acuerdo con los contenidos establecidos. Para dar cumplimiento a esta norma un comité de evaluación y certificación de este consejo realiza visitas periódicas a los establecimientos para evaluar y certificar los programas de cuidado de los animales.

En Sudamérica se sigue en general el modelo de FELASA, varios países han dictado cursos de categoría B y C, Argentina, Brasil, Chile y Uruguay son ejemplos de ello. Sin embargo, estos cursos no son regulares, es decir que no forman parte de un programa a nivel nacional o institucional ni se imparten en forma continua.

En el caso de Argentina, es en las universidades donde se inicia la organización de cursos de grado y posgrado sobre cuidado, manejo y uso de animales de experimentación. Actualmente la Universidad del Litoral (UNL), Universidad de Buenos Aires (UBA) y la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) ofrecen cursos de esta especialidad. La UNLP fue la primera y la única hasta el momento que ha incluido en su plan de estudios el curso obligatorio denominado Introducción a la Ciencia de los Animales de Laboratorio y una materia Animales de Experimentación en la carrera de Microbiología Clínica e Industrial.

Durante los últimos años hasta la actualidad, el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (MinCyT) a través del apoyo financiero otorgado por el Sistema Nacional de Bioterios (SNB) ha fomentado la realización de actividades destinadas a la formación de recursos humanos en ciencia y bienestar de animales de experimentación.

Es importante también la existencia de la Carrera de Técnico para bioterios que se dicta en la UBA ([ffyb.uba.ar/alumnos/2021](http://fyb.uba.ar/alumnos/2021)) Tiene una duración de tres años y medio y califica ampliamente para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Tiene el inconveniente que se imparte en la Ciudad de Buenos Aires y excepcionalmente los técnicos que egresan ejercen en otras provincias argentinas.

En nuestro país la educación del personal técnico y científico no está armonizada, esto significa que no hay un programa nacional de cuidado de los animales que exija el cumplimiento determinado contenidos para habilitar dicho personal. Tampoco cuenta con una especialidad en ciencia y bienestar de animales de experimentación. Asimismo, al no existir una ley nacional en esta temática, no hay exigencias formales para trabajar en los bioterios ni para usar animales con fines científicos. Tampoco a nivel nacional existe la formación de veterinarios especialistas en medicina de animales de laboratorio. Sin embargo, el interés y la oferta educativa se han incrementado especialmente a partir del funcionamiento de los CICUALes.

Referencias

FELASA recommendations on the education and training of persons working with laboratory animals: Categories A and C. *Laboratory Animals* 1995; 29: 121-131

FELASA accreditation of education and training courses in laboratory animal science according to the Directive 2010/63/EU. Volume: 53 issue: 2, page(s): 137-147 <https://doi.org/10.1177/0023677218788105>. July 24, 2018 Issue published April 1, 2019

Griffin, Gilly Establishing a Three Rs programme at the Canadian Council on Animal Care. *Altern Lab Anim.* 2009 Dec; 37 Suppl 2:63-7 doi: 10.1177/026119290903702S09.

<https://www.aalas.org/education/educational-resources/educational-products-updates>

<http://www.ffyb.uba.ar/ALUMNOS/ampliacion-contenido-alumnos/plan-de-estudios>

DIRECTIVA 2010/63/UE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. 2010

CAPÍTULO 4

Bienestar en animales de experimentación

Agustina Resasco

La Ciencia de los Animales de Laboratorio es una especialidad dentro de la Medicina Veterinaria que se enfoca en desarrollar modelos experimentales para mejorar la calidad de vida tanto del ser humano como de otros animales. En este sentido, la forma en que alojamos a dichos animales corresponde a un aspecto fundamental de este proceso. Esto se debe a que las perturbaciones ambientales pueden alterar la fisiología de los individuos y, como consecuencia, modificar las variables experimentales (Balcombe y col., 2004). Sin embargo, no solo es importante considerar la calidad de la experimentación biomédica sino también las obligaciones morales que poseemos hacia aquellos organismos que están bajo nuestro cuidado. Es por esta razón que el Bienestar Animal se asocia ineludiblemente con la Ciencia de los Animales de Laboratorio, como forma de evaluar científicamente cómo los procedimientos experimentales y las condiciones de alojamiento impactan sobre la calidad de vida de los animales (Baumans, 2005).

Tradicionalmente, la protección de las especies animales no humanas se enfocaba principalmente hacia aquellas con una mayor similitud filogenética con nosotros mismos. Sin embargo, en la similitud con nuestra especie no radica la importancia del cuidado de los animales de experimentación sino en las experiencias subjetivas, placenteras o aversivas, que son capaces de percibir. En definitiva, consiste en diferenciar aquellos individuos que son sentientes de los que no. Broom (2016) define a un organismo sentiente como aquel que posee al menos alguna de las siguientes habilidades: (I) evaluar las acciones de otros en relación a si mismo y a terceros, (II) recordar sus propias acciones y sus consecuencias, (III) evaluar riesgos y beneficios, (IV) poseer sentimientos y (V) tener algún grado de conciencia. Esta última, definida como el análisis complejo en el cerebro de estímulos sensoriales o de construcciones realizadas a partir de la memoria que generan un estado de autoreconocimiento y de apreciación acerca de la relación de uno con el ambiente (que en inglés se denomina “awareness” para diferenciarla del estado de conciencia propiamente dicho que se pierde, por ejemplo, al realizar una anestesia).

De esta forma, la Ciencia del Bienestar Animal surge como forma de estudiar a estos individuos sentientes. Sin embargo, la misma suele ser difícil de definir, ya que los distintos enfoques sobre los cuales se basa pueden llegar a ocasionar conflictos en la interpretación de los resultados. El bienestar animal típicamente se describe como el estado de un animal en sus intentos por enfrentarse con el medio ambiente (Broom, 1991), en el que entran en juego una serie

componentes tanto físicos como psicológicos. Así surge uno de los principales debates acerca de la definición del término, en el que algunos autores se centraron únicamente en evitar las experiencias afectivas negativas. Sin embargo, 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 (Mellor, 2015). Al día de la fecha, algunos de los puntos en discusión radican en determinar si los animales son conscientes o no de los eventos que acontecen a su alrededor y en especificar qué especies son sentientes y por lo tanto cuáles deberían ser protegidas por las distintas legislaciones.

Además de la definición citada, Broom (1991) describe determinadas características que se deben tener en cuenta:

- 1) El bienestar animal es una característica propia del animal, y por lo tanto no es un elemento que se le pueda brindar (aunque sí se le pueden modificar las condiciones en las que el individuo habita para que dicha propiedad mejore).
- 2) El bienestar animal puede verse como un continuo, que va desde muy bueno a muy malo. El bienestar de cada animal se va a situar en cualquier lugar de dicha escala, según las experiencias propias de cada individuo y la habilidad para lidiar con el ambiente en un momento dado.
- 3) Un animal posee múltiples herramientas para lidiar con los desafíos del ambiente, y tanto una dificultad como una falla completa para enfrentarse al mismo van a repercutir sobre el bienestar.
- 4) El bienestar debe medirse únicamente mediante indicadores objetivos, más allá de las consideraciones morales hacia los animales. De esta forma, las determinaciones acerca de la eficiencia con la que un animal enfrenta las distintas situaciones que se le presentan puede ser una forma de obtener información sobre cómo es el estado interno del individuo.
- 5) Un estudio acerca de las preferencias específicas del animal nos puede brindar información objetiva acerca de cómo mejorar su bienestar. Esto puede realizarse a través de estudios de preferencia (en los que se determinan las elecciones que hace un animal cuando se le ofrecen al mismo tiempo varios recursos) y de fuerza de motivación (en los que se observa cuánto están dispuestos a trabajar para acceder a un recurso). Sin embargo, hay que considerar que las preferencias de los individuos no implican necesariamente el bienestar a largo plazo por lo que los profesionales veterinarios deberían evaluar cuál es el efecto de cada recurso sobre la salud en el tiempo (por ejemplo, el animal puede preferir una dieta alta en grasas, pero la misma puede predisponer a obesidad).

El bienestar animal depende de los procesos cerebrales que están involucrados en la apreciación subjetiva que tiene cada individuo de su estado interno y de su ambiente. Es por esto que para poder determinar el estado de los animales en términos de un bienestar bueno o deficitario debemos ser capaces de “leer sus mentes”. La evaluación del bienestar animal es por lo tanto complicada, debido a que no nos permite obtener una respuesta directa de esta caracte-

rística. La interpretación de indicadores fisiológicos no siempre es sencilla de realizar, ya que situaciones que muy probablemente produzcan estados afectivos opuestos suelen desencadenar la misma respuesta fisiológica. En este sentido, pareciera que al menos algunos indicadores fisiológicos (tales como los glucocorticoides que se secretan ante una situación que conlleva 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). Para sobrellevar esta situación, Fraser (2008) propone tres dominios sobre los cuales se pueden desprender indicadores de bienestar animal:

Funcionamiento biológico

Los animales deberían crecer y desarrollarse correctamente, evitando estados patológicos. La sola presencia de un agente potencialmente patógeno no es determinante para afectar el bienestar de un individuo, pero cualquier modificación sobre la biología que deba generar una corrección por parte del animal para mantener las funciones normales pueden ser usados como indicadores de bienestar animal. De la misma forma cualquier modificación que se detecte, por ejemplo, en determinadas hormonas, pueden ser usados como indicadores. El ejemplo más frecuente se corresponde con la respuesta de estrés, ya que su función principal es generar energía rápidamente para enfrentarse a los desafíos ambientales, independientemente de si estos desafíos son placenteros o aversivos para el animal. Esta respuesta generalmente está asociada a dos sistemas, el simpático-adrenomedular (SAM), cuya respuesta es inmediata y produce efectos tales como la liberación de glucosa, piloerección y la dilatación pupilar, y el sistema hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA), con una respuesta más retardada, y que culmina con la generación de glucocorticoides.

Vida natural

Los animales deberían poder expresar aquellos comportamientos específicos de especie que están intrínsecamente motivados a realizar, los que se conocen como necesidades comportamentales. Por este motivo, las consecuencias sobre el bienestar van a ser de mayor magnitud cuando el animal no pueda realizar este tipo de comportamientos, más allá que las necesidades fisiológicas de los mismos se encuentren satisfechas.

Estados afectivos

Los estados afectivos son respuestas comportamentales y fisiológicas que varían en términos de valencia (positivo/ negativo) e intensidad. Muchos autores lo utilizan en reemplazo de la palabra emoción ya que éstos no implican la percepción consciente de las mismas. Los animales deberían prescindir, siempre que sea posible, de estados afectivos negativos, al mismo tiempo que deberían poder experimentar estados afectivos positivos.

Del apartado anterior se desprende el carácter multidisciplinario de la Ciencia del Bienestar Animal, en la que los tres aspectos se pueden medir a partir de indicadores objeti-

vos independientes entre sí. La decisión sobre qué indicadores tomar como referencia tiene que ver con el área del conocimiento de la cual provenga el investigador y con valores asignados a la persona en una cultura y una sociedad en particular. Las variables sobre las cuales uno establezca el énfasis muchas veces son lo suficientemente independientes como para que al mejorar los indicadores de una de ellas se obtengan resultados completamente diferentes en las otras dos. Por este motivo, es posible inferir condiciones opuestas a partir de una misma situación. Para reducir este sesgo, al realizar una evaluación integral del bienestar animal se deberían ponderar aspectos provenientes de distintas áreas. Por lo tanto, en la investigación reciente en bienestar animal se están aplicando enfoques multidisciplinarios para estudiar la mente animal, de forma de poder desarrollar metodologías para “preguntarle” cómo se siente y ser capaces de entender su respuesta en base al comportamiento que desarrolla. Estas herramientas se basan en cómo el animal evalúa subjetivamente su propia situación, adapta su comportamiento y selecciona la respuesta más apropiada para obtener el mejor resultado posible.

Evaluación del bienestar animal

Estados patológicos y eficiencia productiva

La salud y el funcionamiento apropiado de los distintos sistemas del cuerpo son un conjunto de indicadores utilizados tradicionalmente para evaluar el bienestar animal (Gaskill y col., 2013). De esta forma, el compromiso de la integridad física debido a enfermedades, heridas o alteraciones morfológicas es una metodología sencilla para reconocer y cuantificar una disminución en el mismo (Ullman-Culleré y Foltz, 1999). Sin embargo, hay que tener cuenta que este indicador por sí mismo no puede ser tomado como la única variable a tener en cuenta al ponderar el bienestar animal. Esto es debido a que pueden existir modificaciones más sutiles en la fisiología que no son detectables a simple vista cuando se presentan enfermedades subclínicas o inclusive, puede existir sufrimiento en los animales debido a que éstos son mantenidos en condiciones que no contemplan todas sus necesidades comportamentales. Además, otro factor de confusión corresponde a la relación entre el bienestar animal y la productividad, especialmente en los sistemas de producción intensiva. En particular en ratas puede observarse que, si bien generalmente se las mantienen en recintos que impiden comportamientos básicos tales como estirarse verticalmente (Makowska y Weary, 2016), la eficiencia reproductiva pareciera no verse comprometida.



En la imagen se muestran dos ratas con signos clínicos en las que el bienestar se encontraría comprometido. Presencia de lateralización de la cabeza (izquierda) y postura antiálgica conjuntamente con pelo hirsuto y lesiones cutáneas (derecha).

Estrés

Conjuntamente con los indicadores de salud física, la respuesta de estrés constituye otro indicador clásico cuando se desea evaluar el estado de un animal en relación al medio que lo rodea. Esto es debido a que el estrés es un término empleado para describir tanto a aquellos factores que requieren mecanismos de adaptación, como la respuesta del organismo a esos desafíos. De esta forma, el término “estrés” muchas veces genera confusiones en su definición ya que se lo utiliza para describir el estímulo que genera la respuesta, la respuesta propiamente dicha y la experiencia subjetiva asociada a la respuesta de estrés. Su magnitud depende por un lado de las expectativas que fueron adquiridas a lo largo de la vida del animal y por el otro del abanico de respuestas que dispone el individuo (Veissier y Boissy, 2007). El estrés propiamente dicho es una respuesta de alarma, esto es, un incremento en la activación de los sistemas para generar una respuesta apropiada a los distintos desafíos. Por lo tanto, dicha reacción es imprescindible para la supervivencia y sólo genera efectos patológicos cuando ésta es sostenida a lo largo del tiempo (Crofton y col., 2015).

La respuesta de estrés está conformada principalmente por dos elementos: el sistema simpático-adrenomedular (SAM) y el sistema hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA). De esta forma, la activación del sistema nervioso autónomo ante un estímulo estresante afecta una serie diversa de sistemas biológicos, que incluye los sistemas cardiovascular y digestivo, las glándulas exocrinas y la médula adrenal. Como resultado, se generan cambios en la presión sanguínea, la

frecuencia cardíaca, el metabolismo de la glucosa y la actividad gastrointestinal. Sin embargo, debido a que estos cambios son de corta duración, podría asumirse que el efecto que tiene sobre el bienestar animal a largo plazo no sería significativo. Por el contrario, las hormonas secretadas por el sistema HPA generan efectos extensos y a largo plazo en el organismo. Así, prácticamente todas las funciones biológicas se ven afectadas por los glucocorticoides, e incluyen la respuesta inmune, la reproducción, el metabolismo, el comportamiento, entre otras. Los cambios en la circulación plasmática de los glucocorticoides hormonales (cortisol o corticosterona, según la especie) muchas veces se han equiparado con la respuesta de estrés. Sin embargo, también se ha descrito que la secreción de otras hormonas tales como la prolactina y la hormona de crecimiento son igualmente sensibles ante un estresor. Igualmente, tanto la hormona liberadora de tiotropina (TSH) como las gonadotrofinas (luteinizante-LH y folículo estimulante-FSH) están moduladas directa o indirectamente por el estrés (Pekow, 2005).

En particular la corticosterona, el principal glucocorticoide en roedores, se libera según el ritmo circadiano, con picos máximos durante las primeras horas del período de oscuridad y mínimos las primeras horas del ciclo lumínico. Sus metabolitos fecales presentan la misma curva de liberación, pero con un retraso de entre 6 y 9 horas (Dallmann y col., 2006). Esta curva puede verse alterada, aumentando su liberación, ante una situación de estrés agudo. Así, el efecto biológico inmediato presente en los desafíos agudos fue extensamente estudiado, y la respuesta de alarma generada ante la mayoría de los estresores activa los sistemas de forma relativamente estandarizada. Sin embargo, si el estímulo se sostiene por un tiempo lo suficientemente prolongado, los niveles sistémicos de corticoides suelen regresar al nivel basal o inferior dado por el agotamiento del sistema. Debido a que la mayoría de los factores que atentan en contra del bienestar de los animales de experimentación son de tipo crónico, se debería intentar a elucidar los mecanismos de readaptación que produce el organismo. De esta forma, aquellos animales que deben enfrentar situaciones que sobrepasan sus capacidades de adaptación pueden llegar a desarrollar úlceras gástricas, hipertensión, falla cardíaca, inmunosupresión y cambios en la bioquímica del cerebro (Carstens y Moberg, 2000).

Dolor

El dolor en animales se define como una experiencia sensorial aversiva causada por un daño potencial o real, y que promueve reacciones motoras y vegetativas de protección. Esto resulta en comportamientos para evitar dicha amenaza y en posibles alteraciones del comportamiento específico de especie (Carstens y Moberg, 2000). De esta forma, el dolor implica un componente emocional por lo que se lo diferencia de la mera nocicepción. La forma en que cada especie manifiesta el dolor va a depender de la especie en cuestión y de la presencia del observador humano, por lo cual su evaluación muchas veces resulta complicada y requiere de un entrenamiento previo. La reducción del peso corporal y del consumo de agua y alimento han sido usados como indicadores sencillos de dolor, sobre todo en el período post-operatorio. De

la misma forma, la respuesta a la terapia analgésica puede ser un indicador de que un procedimiento resulta doloroso para el animal, pero ello requeriría ser capaz de distinguir indicadores de dolor previo. La respuesta fisiológica ante un dolor agudo podría llegar a utilizarse para este fin, pero en roedores de laboratorio y en particular en ratones estos indicadores son difíciles de medir debido al pequeño tamaño de los mismos y también, tal como fue descrito en el apartado anterior, a la restricción del movimiento que muchas veces es necesaria para tomar muestras y que muy probablemente modifica dichas variables. Más recientemente, se describió una metodología para evaluar la intensidad dolorosa en animales basado en las expresiones faciales que los mismos realizan (Langford y col., 2010).

Indicadores comportamentales

Los signos clínicos evidentes de sufrimiento que se generan a partir de las manifestaciones de dolor y de distintos estados patológicos en roedores de experimentación suelen aparecer cuando los animales presentan un sufrimiento inaceptable para los estándares regulatorios y por lo tanto exigen una intervención inmediata del profesional veterinario. En este sentido, los comportamientos que pueden ser observados de forma sencilla y no invasiva pueden ser indicadores más sensibles del estado interno de un animal, comparados con las herramientas clásicas de control clínico. Las observaciones en la caja donde normalmente habitan los roedores de experimentación son particularmente ventajosas ya que implican un mínimo estrés del animal y por lo tanto consiguen reducir los efectos indeseados que pueden desencadenarse a partir de las pruebas comportamentales clásicas tales como estrés generado por la novedad, analgesia inducida por el estrés, y otros cambios en la fisiología y en el comportamiento causados por el ambiente desconocido (Jirkof, 2014).

Entre estos, existen comportamientos específicos de especie que el animal está intrínsecamente motivado a realizar, más allá que las necesidades fisiológicas asociadas a la función de cada comportamiento se encuentren satisfechas, que se conocen como necesidades comportamentales. El grado de motivación de estos comportamientos en un momento dado está determinado por una combinación entre el estado fisiológico y los estímulos externos presentes, y determina la probabilidad y la intensidad con la que los animales ejecutarán un comportamiento. En particular los comportamientos complejos e intrínsecamente motivados han demostrado ser de utilidad para evaluar el dolor, el estrés y el sufrimiento de los ratones de laboratorio. Esto es debido a que los mismos, al no ser esenciales para la supervivencia en el laboratorio, suelen ser los primeros en disminuir cuando los desafíos ambientales amenazan la integridad del individuo. Por lo tanto, su ausencia puede indicar una reducción en el bienestar. Por ejemplo, la performance en la construcción del nido y de la madriguera, han sido postulados como dos de estos tipos de comportamientos complejos. Así, se observó una disminución en la motivación para realizar estos dos comportamientos tanto en múltiples estados patológicos como enfermedades infecciosas, enfermedad de Alzheimer, Parkinson, entre otras (Jirkof, 2014).



Ejemplificación de dos pruebas comportamentales que se realizan en la caja donde normalmente habitan los ratones y que utilizan comportamientos intrínsecamente motivados. En el “Burrowing Test” (izquierda) se evalúa la motivación para realizar la madriguera y en la evaluación de la calidad de nido (derecha) se califica la complejidad del nido realizado mediante una escala cualitativa.

Indicadores emocionales

Las emociones son respuestas afectivas que se desencadenan ante un determinado evento, en donde dicha respuesta es relativamente intensa y de corta duración. Éstas muy probablemente evolucionaron como mecanismos básicos adaptativos que le permitieron al animal evitar situaciones dañinas o perjudiciales, así como obtener recursos valiosos. Las emociones se manifiestan a partir de elementos comportamentales, fisiológicos, neurales y, al menos en humanos, a partir del componente subjetivo. Para evitar hablar del componente subjetivo, muchos investigadores hacen referencia a las emociones animales como estados afectivos, y los clasifican en términos de la respuesta comportamental y fisiológica que puede variar en relación a la valencia (placentero/aversivo) y la intensidad de su activación (Mendl y col., 2010).

Por lo tanto, para estudiar las emociones animales se pueden tomar cada uno de estos componentes individualmente o en combinación. Así, por ejemplo, las determinaciones fisiológicas en general se corresponden con aquellas usadas para estudiar la respuesta de estrés, principalmente porque ésta suele ser vista en situaciones que muy probablemente posean estados afectivos negativos. Sin embargo, deben analizarse con precaución, ya que, en situaciones con estados afectivos opuestos, la respuesta fisiológica generada puede llegar a ser la misma. De la misma forma, analizar el comportamiento espontáneo o el desencadenado ante distintas pruebas comportamentales puede utilizarse para demostrar las tendencias de acción que acompañan estados emocionales particulares. En particular, existen múltiples pruebas comportamentales originadas de la psiquiatría que se utilizan para estudiar las distintas patologías y para el desarrollo de nuevos fármacos que pueden ser aplicadas en el campo del bienestar animal para entender, por ejemplo, cómo las condiciones ambientales y de manejo impactan sobre los estados emocionales de los animales. Entre estas pruebas pueden citarse el

campo abierto, el laberinto en cruz elevado, el test de natación forzado, entre otras, que principalmente se utilizan para estudiar comportamientos asociados a la depresión y la ansiedad (Belzung y Griebel, 2001; Krishnan y Nestler, 2011). Además, se están desarrollando técnicas específicas para evaluar el bienestar animal, tal como la prueba de sesgo cognitivo. Dicha técnica estudia los sesgos en el juicio, en la memoria o en la atención que se desencadenan cuando los animales experimentan un cambio en su estado emocional (Harding y col., 2004; Resasco y col., 2021).



Ratón en una prueba de campo abierto, un tipo de metodología utilizado frecuentemente para analizar ansiedad en roedores de experimentación.

Promoción del bienestar animal (enriquecimiento ambiental)

Bajo los estándares actuales, el nivel de bienestar que se considera ideal va más allá de los estándares regulatorios: es la diferencia entre un estado bueno y uno óptimo de bienestar. Una forma posible de lograr este nivel óptimo de bienestar es estableciendo oportunidades para realizar comportamientos gratificantes, en particular aquellos asociados a la exploración, la alimentación y los comportamientos afiliativos. En general, aquellos ambientes que promueven comportamientos activos, diversos y flexibles son preferibles a aquellos que generan comportamientos apáticos o estereotipados.

El enriquecimiento ambiental hace referencia a una combinación de estimulación inanimada compleja y social que mejora la estimulación sensorial, cognitiva, motora y social, comparado con las condiciones estándar de alojamiento (Crofton y col., 2015; Olsson y Dahlborn, 2002). Sobre todo, el enriquecimiento ambiental provee a los animales de oportunidades para realizar

comportamientos específicos de especie (Meehan y Mench, 2007). Estas modificaciones ambientales deberían estar claramente especificadas en los materiales y métodos cuando se redactan los trabajos científicos, de forma de permitirle a otros grupos de investigadores repetir dichas experiencias.

Cuando en cada institución se diseña un protocolo de enriquecimiento ambiental, los esfuerzos deberían enfocarse hacia qué comportamientos se desean promover. De esta forma, resulta imprescindible conocer el comportamiento específico de especie, para poder brindarle al animal estructuras apropiadas en su ambiente que le permitan desarrollar dichos comportamientos. A modo de ejemplo, se describen comportamientos altamente motivados en los ratones de laboratorio (*Mus musculus*), que podrían fomentarse cuando se diagrama cada protocolo según las condiciones particulares de cada lugar:

- Nidificación: los nidos son sumamente importantes para los roedores como una forma de conservar el calor, para la reproducción y para refugiarse tanto de las condiciones climáticas como de los depredadores. Debido a que su pequeño tamaño los hace muy susceptibles a la pérdida de calor, tanto el macho como la hembra construyen nidos de tamaño similar (Gaskill y col, 2009). Sin embargo, en la hembra la construcción del nido está influenciada por el balance hormonal y el estatus reproductivo, y la habilidad para construirlo influencia directamente al éxito reproductivo. El material de nido es sumamente valorado como adición a la caja de los ratones, y puede provenir de una gran variedad de elementos tales como algodón, papel tissue, tiras de papel madera e hilo sisal.
- Realización de la madriguera: muchos roedores silvestres construyen madrigueras para escaparse de los predadores, crear microclimas confortables, almacenar alimento y construir el nido. Los ratones son muy eficientes en la construcción de túneles sobre sustratos blandos, y pueden vivir en madrigueras que van desde túneles simples de un metro de longitud que finalizan en una cámara circular a sistemas complejos de túneles con numerosas cámaras y salidas. Este comportamiento está altamente motivado y los ratones trabajan para acceder a sitios con sustratos que le permitan realizar este comportamiento (Sherwin y col, 2004).
- Búsqueda de alimento: los ratones consumen hasta el 20% de su peso corporal diariamente, realizando aproximadamente 200 pequeñas comidas nocturnas en las que se incluye una variedad de alimentos como semillas, larvas, frutos, etc (Latham y Mason, 2004). Es por esto que los ratones pasan una gran parte del período activo forrajeando y eligen realizar esta actividad, aunque posean libre acceso a una fuente de alimentación. Esto se contrapone claramente con el régimen de alimentación que reciben en el laboratorio, con alimentación monótona suministrada *ad libitum*.
- Exploración: los ratones exploran intensamente objetos novedosos que no están marcados con olores familiares. Inicialmente se presentan cautos con respecto a los mismos, y se aproximan a ellos de forma característica acercándose con el tren anterior mientras permanecen con los miembros posteriores fijos. También pueden

evitarlos activamente o intentar eliminarlos cubriéndolos con el sustrato. Sin embargo, en general aceptan los elementos nuevos relativamente rápido, marcándolos para incorporarlos al territorio.

- Presencia de un refugio/túnel: los ratones son muy sensibles al sentido del tacto. Los bigotes se mueven de forma activa a medida que el ratón se desplaza y envían información directamente hacia la corteza, permitiéndole identificar texturas y evitar obstáculos, inclusive, con niveles muy bajos de luminosidad. Además, los pelos táctiles presentes en su superficie corporal les permiten mantener el contacto con las distintas superficies a medida que se desplazan (*thigmotaxis*), una característica muy importante ya que los ambientes abiertos les generan ansiedad (Latham y Mason, 2004).



Ratón alojado en una caja enriquecida, interactuando con un elemento cuyo objetivo consistió en promover comportamientos de exploración. Dicho objeto estaba conformado por un tubo de cartón con ambos extremos sellados y relleno de viruta de álamo y almendras picadas. En la imagen se observa un ratón nude escavando en la viruta mientras busca los trozos de almendra mezclados en ella.

Referencias

- Balcombe, J. P., Barnard, N. D., y Sandusky, C. (2004). Laboratory routines cause animal stress. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 43(6), 42-51.
- Baumans, V. (2005). Science-based assessment of animal welfare: laboratory animals. *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties*, 24(2), 503.
- Belzung, C., y Griebel, G. (2001). Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behavioural Brain Research*, 125(1-2), 141-149.
- Broom, D. M. (1991). Animal welfare: concepts and measurement. *Journal of Animal Science*, 69(10), 4167-4175.
- Broom, D. M. (2016). Sentience and animal welfare: New thoughts and controversies. *Animal Sentience*, 1(5), 11.
- Carstens, E., y Moberg, G. P. (2000). Recognizing pain and distress in laboratory animals. *Ilar Journal*, 41(2), 62-71.

- Crofton, E. J., Zhang, Y., y Green, T. A. (2015). Inoculation stress hypothesis of environmental enrichment. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 49, 19-31.
- Dallmann, R., Touma, C., Palme, R., Albrecht, U., y Steinlechner, S. (2006). Impaired daily glucocorticoid rhythm in Per1 Brd mice. *Journal of Comparative Physiology A*, 192(7), 769-775.
- Fraser, D. (2008). Understanding animal welfare. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 50(1), 1-7.
- Gaskill, B. N., Rohr, S. A., Pajor, E. A., Lucas, J. R., y Garner, J. P. (2009). Some like it hot: mouse temperature preferences in laboratory housing. *Applied Animal Behaviour Science*, 116(2-4), 279-285.
- Gaskill, B. N., Winnicker, C., Garner, J. P., y Pritchett-Corning, K. R. (2013). The naked truth: Breeding performance in nude mice with and without nesting material. *Applied Animal Behaviour Science*, 143(2-4), 110-116.
- Harding, E. J., Paul, E. S., y Mendl, M. (2004). Cognitive bias and affective state. *Nature*, 427(6972), 312-312.
- Jirkof, P. (2014). Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. *Journal of Neuroscience Methods*, 234, 139-146.
- Krishnan, V., y Nestler, E. J. (2011). Animal models of depression: molecular perspectives. *Molecular and Functional Models in Neuropsychiatry*, 121-147.
- Langford, D. J., Bailey, A. L., Chanda, M. L., Clarke, S. E., Drummond, T. E., Echols, S., ...y Matsumiya, L. (2010). Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nature Methods*, 7(6), 447.
- Latham, N. y Mason, G. (2004). From house mouse to mouse house: the behavioural biology of free-living *Mus musculus* and its implications in the laboratory. *Applied Animal Behaviour Science*, 86(3-4), 261-289.
- Makowska, I. J., y Weary, D. M. (2016). The importance of burrowing, climbing and standing upright for laboratory rats. *Royal Society Open Science*, 3(6), 160136.
- Meehan, C. L., y Mench, J. A. (2007). The challenge of challenge: can problem solving opportunities enhance animal welfare? *Applied Animal Behaviour Science*, 102(3-4), 246- 261.
- Mellor, D. J. (2015). Positive animal welfare states and reference standards for welfare assessment. *New Zealand Veterinary Journal*, 63(1), 17-23.
- Mendl, M., Burman, O. H., y Paul, E. S. (2010). An integrative and functional framework for the study of animal emotion and mood. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1696), 2895-2904.
- Olsson, I. A. S., Nevison, C. M., Patterson-Kane, E. G., Sherwin, C. M., Van de Weerd, H. A., y Würbel, H. (2003). Understanding behaviour: the relevance of ethological approaches in laboratory animal science. *Applied Animal Behaviour Science*, 81(3), 245-264.
- Olsson, I. A. S., y Dahlborn, K. (2002). Improving housing conditions for laboratory mice: a review of 'environmental enrichment'. *Laboratory Animals*, 36(3), 243-270.
- Pekow, C. (2005). Defining, measuring, and interpreting stress in laboratory animals. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 44(2), 41-45.

- Resasco, A., MacLellan, A., Ayala, M. A., Kitchenham, L., Edwards, A. M., Lam, S., Dejardin, S. y Mason, G. (2021). Cancer blues? A promising judgment bias task indicates pessimism in nude mice with tumors. *Physiology & Behavior*, 113465.
- Sherwin, C. M., Haug, E., Terkelsen, N., y Vadgama, M. (2004). Studies on the motivation for burrowing by laboratory mice. *Applied Animal Behaviour Science*, 88(3-4), 343-358.
- Ullman-Culleré, M. H., y Foltz, C. J. (1999). Body condition scoring: a rapid and accurate method for assessing health status in mice. *Comparative Medicine*, 49(3), 319-323.
- Veissier, I., y Boissy, A. (2007). Stress and welfare: Two complementary concepts that are intrinsically related to the animal's point of view. *Physiology & Behavior*, 92(3), 429-433.

CAPÍTULO 5

Diseño y planificación de bioterios

Fabricio Maschi y Estela Rogers

Consideraciones previas

El buen diseño de instalaciones para el alojamiento de animales de laboratorio combinado con un buen manejo de los mismos es esencial para el bienestar de dichos animales, para la calidad de las investigaciones y la producción, para los ensayos en los que pueden utilizarse y para la salud y seguridad del personal. Las condiciones del entorno donde se crían y mantienen, y aquellas donde se realizan las experiencias de investigación, influyen en gran medida en la variabilidad de los resultados experimentales. Durante gran parte de la historia, el insuficiente control de las variables que actuaban sobre la respuesta del animal, como por ejemplo los parámetros ambientales, su estado sanitario, su alimentación y las condiciones de manejo fueron causales de frustración de muchísimos experimentos.

A medida que se fue conociendo la forma en que estos factores impactaban en los animales se comprendió la necesidad de controlarlos mediante instalaciones adecuadas que permitieran disminuir la variabilidad de los resultados experimentales, el número de animales utilizados y mejorar la calidad de las investigaciones realizadas.

Los Bioterios se definen como un recinto construido y habilitado con determinados requisitos técnicos y con equipamiento suficiente para criar, mantener y experimentar con animales, garantizar su bienestar y obtener datos válidos y reproducibles.

Un bioterio moderno hoy constituye una instalación específicamente diseñada para la producción y experimentación con animales en condiciones estandarizadas, donde se controlan exhaustivamente las condiciones ambientales, los requerimientos fisiológicos y etológicos de las especies que se mantienen, la logística y la seguridad del ambiente laboral para los técnicos e investigadores.

Para el desarrollo de cualquier proyecto lo ideal es determinar el espacio total que demandará la instalación y reunir la mayor información sobre las distintas funciones que se llevarán a cabo en la misma, las especies a mantener, los usuarios y sus actividades específicas.

Es deseable que se definan los objetivos de ese bioterio, para facilitar la planificación y su diseño, es decir; establecer si se realizará sólo experimentación con animales, sólo producción o si se destinará a ambas actividades.

La información que hay que reunir sobre las especies debe incluir:

Qué especies y líneas se mantendrán y si se criaran en el bioterio.

Qué calidad sanitaria o estatus microbiológico es requerido para cada una de ellas.

Cuál es el número máximo de animales que se mantendrán en experimentación

Qué cantidad de animales provendrán de otras instituciones.

Respecto a las investigaciones que se realicen es fundamental conocerlas previamente para determinar las necesidades de espacio e infraestructura para los laboratorios, como así también tener conocimiento sobre la conformación de los grupos de investigación, lo que permitirá un mejor diseño de las unidades funcionales destinadas a esta actividad. Por ejemplo:

Quirófanos (filtración del aire, pre-quirófanos, lavamanos especiales).

Diagnóstico por imágenes, rayos X, resonancia magnética, radioisótopos (aislamiento magnético, aislamiento a la radiación, tratamiento del aire extraído).

Infección experimental (nivel de bioseguridad requerido, tratamiento del aire, presurización diferencial, tratamiento de residuos y desagües).

Toxicología (jaulas especiales, refrigeración especial).

Comportamiento (aislamiento acústico, fotoperiodo invertido, visores).

Docencia (ubicación de laboratorios de práctica, aulas).

Esta recopilación de información requiere de la experiencia de un asesor para que pueda intercomunicarse con los diversos actores: investigadores, técnicos, dirección técnica de la obra, también deberá estar capacitado para conocer los posibles equipos a ser instalados y sus tamaños, el requerimiento de suministros para los mismos (potencia eléctrica, consumos, desagües, refrigeración, etc.).

Los bioterios dotados de los medios apropiados para todos estos requerimientos son muy costosos por lo tanto es muy importante hacer todo lo posible para asegurarse que sean programados, diseñados y construidos en función del tamaño y de la extensión para el uso de animales del momento, pero con la flexibilidad suficiente para satisfacer futuras necesidades (Vivarium Design Policy and Guidelines, 1996).

Diseño: distribución de espacios y áreas específicas

Un proyecto de diseño para este tipo de instalaciones requiere de una serie de consideraciones a tener en cuenta y que son aplicables en la mayoría de las situaciones:

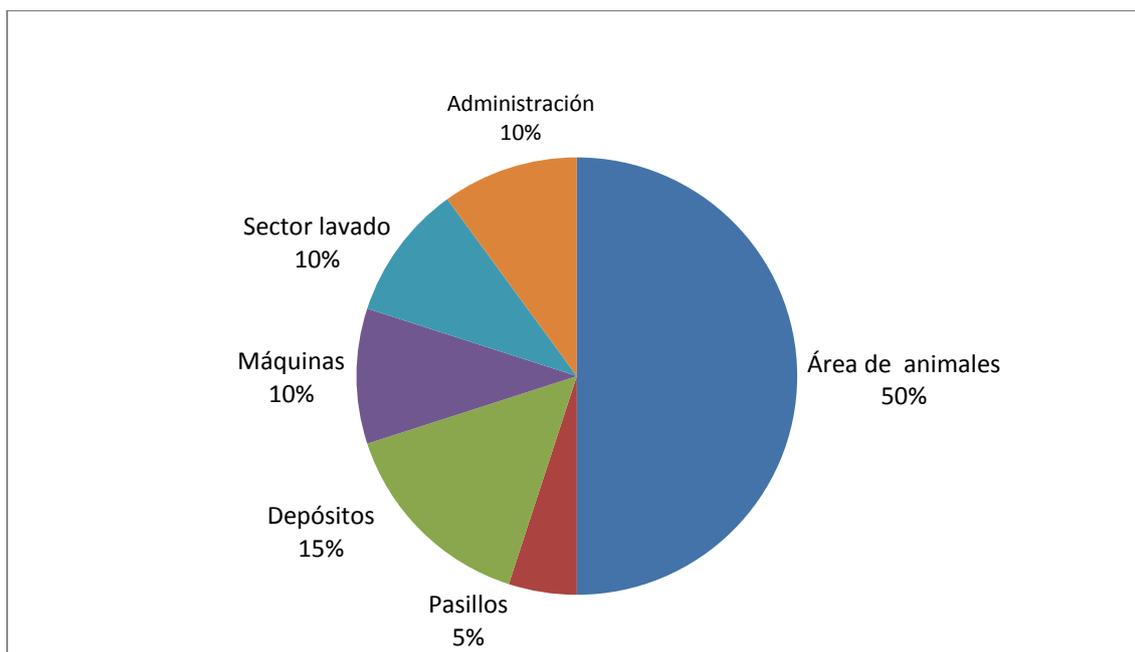
Los diseños deben ser de fácil adaptación a nuevos requerimientos o remodelaciones a corto o mediano plazo.

Deben tener fácil acceso a inspecciones, reparaciones, y revisiones de rutina de equipos e instalaciones.

Es ideal contar con asesores o consultores expertos y con experiencia en problemáticas que surgen en la construcción y mantenimiento de este tipo de instalaciones para colaborar y apoyar a arquitectos o ingenieros que en general no están tan familiarizados en este tipo de emprendimientos.

Fundamentalmente y debido a la amplitud de esta temática, solo enfocaremos información general aplicada a las instalaciones para la cría y mantenimiento de roedores.

Un aspecto de importancia a considerar en el diseño, tiene que ver con la calidad sanitaria de los animales que se van a utilizar y/o el tipo de investigación que se desarrollará, dado que esto se relaciona con aspectos de seguridad para los animales y las personas que trabajen con ellos. En base a esto para el diseño es necesario considerar si se debe contar con áreas bajo barreras (o áreas limpias) dentro del bioterio, o si toda la unidad será un ambiente controlado para mantener animales SPF; también es importante conocer si se necesitaran áreas para trabajar con materiales o animales infectados experimentalmente y en este caso establecer cuáles son los niveles de bioseguridad necesarios, y que especies se mantendrán (CCAC, 2003).



Respecto de las proporciones de las distintas áreas funcionales que conforman la instalación, estas son muy variables y dependen del espacio total disponible y su finalidad, como así también de la prioridad de ciertos sectores. En líneas generales se recomiendan como ideales:

Áreas para animales

En estas se incluye no solo donde se mantienen o crían los animales, sino también donde se realizan las experiencias, cuarentena, salas de comportamiento, etc.

Es importante cuando se diseñan las salas de alojamiento, considerar posibles usos futuros de estas instalaciones. Donde el uso de animales ha sido uniforme y constante por varios años, todos los locales se pueden diseñar para el uso de especies de animales específicos. Sin embargo, en muchos bioterios el uso de animales fluctúa considerablemente,

por ésta razón, la polivalencia y la flexibilidad es sumamente importante. Una sala de alojamiento polivalente es un local que encuentra los requerimientos aceptables para el alojamiento de especies diferentes.

Las salas de producción o cría, su diseño, cantidad de salas y dimensiones se determinará de acuerdo con las especies que se necesite criar.

Las salas de mantenimiento dependerán del consumo y edad de los animales a utilizar en las experiencias.

Las salas de experimentación se diseñarán en función del tipo de investigación, cantidad de grupos de investigadores, equipos utilizados e infraestructura necesaria. Deben estar disponibles locales de alojamiento separados para cada especie, según su origen y para cada uno de los proyectos de los investigadores. Por lo tanto, es preferible tener varias salas pequeñas y no pocas salas y grandes. Se puede hacer excepciones cuándo los investigadores utilizan las mismas especies provenientes de la misma fuente, para proyectos diferentes (por ejemplo, producción de anticuerpos en conejos). El alojamiento mezclado se debe limitar a grupos de animales de una misma especie, de condiciones sociales y de salud compatibles. Cuando conviven en el mismo ambiente varias especies, es posible lograr cierto grado de aislamiento mediante un diseño especial de la sala y por la selección del equipo y/o de las jaulas. Se pueden reducir los riesgos de contaminación cruzada con el uso de cubículos de aire controlado, de unidades de flujo laminar portátiles, y de varios tipos de jaulas de aislamiento. Se deben prever salas especiales para el uso de radioisótopos, agentes infecciosos y sustancias altamente tóxicas en caso de que fuera necesario.

Las manipulaciones experimentales no se deben efectuar en los locales de alojamiento de los animales, a menos que sea requerido por el protocolo experimental o por razones de contención y que sea aprobado por el comité de protección de los animales. Deben estar disponibles instalaciones separadas para la cirugía, la eutanasia etc, sin embargo, estas no necesitan estar todas ubicadas dentro de los bioterios. En estos casos, las salas de alojamiento deben estar ubicadas lo más cerca posible de los laboratorios de investigación y salones para enseñanza. (Real Decreto 12/01, 2005).

Los bioterios pueden incluir salas para algunas o todas las actividades siguientes: preparación pre quirúrgica, cirugía, cuidados postoperatorios, radiología, necropsia, servicios diagnósticos, preparación de dietas especiales, droguería o farmacia, etc. El diseño y la organización de instalaciones especiales dependerán de su utilización. Sin embargo, aún con instalaciones de poca magnitud, siempre se debe prever un área especial o un local reservado para cirugías menores y/o tratamientos, además de una sala de necropsias.

Puede ser difícil de prever salas de diagnóstico separadas en los bioterios pequeños. En tales casos, habrá que tomar las medidas necesarias para la provisión de tales servicios (Botet J. y col. 2003).

Las salas de cuarentena, son importantísimas para la recepción de animales procedentes del exterior y/o aislamiento de animales enfermos. Deberán estar separadas del resto de las áreas y cerca del acceso de los servicios. Esta área debe tener el espacio suficiente para el

desembalaje y el examen e inspección inicial de los animales y para mantenerlos bajo condiciones ambientales apropiadas, hasta que sean ubicados en una de las salas para animales. Sus dimensiones y número se determinarán de acuerdo con la capacidad del bioterio, funcionamiento del mismo y especies a alojar.

Áreas de servicio

Dentro de esta se incluyen la sala de lavado, limpieza y desinfección, salas de máquinas o plantas técnicas, depósitos, vestuarios, administración y oficinas, y pasillos de comunicación.

Instalaciones para el personal

Estas áreas funcionales se pueden combinar o separar. Es preferible que estén contiguas y no adentro de las instalaciones de los animales. Se debe considerar un espacio suficiente para el personal administrativo, ocasionalmente técnicos, y para recibir los numerosos archivos que es necesario guardar.

Las instalaciones para el personal deben favorecer altas normas de higiene personal y proveer salas fácilmente accesibles con armarios, duchas, lavamanos e inodoros, dónde el personal se pueda cambiar la indumentaria. Según el diseño de la instalación, puede ser necesario tener este tipo de salas en varios sectores. Se debe proveer ropa protectora apropiada y cumplir con las normas de seguridad e higiene correspondientes.

También se debe contar con salas donde el personal pueda descansar, comer y hacer reuniones de trabajo. Es preferible que estén contiguas, pero fuera del área de alojamiento de los animales. Además, sería muy útil tener una biblioteca donde el personal pueda consultar (puede incluir libros, revistas, boletines, catálogos y otras fuentes de material pertinente al trabajo que allí se desarrolle).

Las salas de lavado, limpieza y desinfección constituyen, junto con el equipamiento necesario, la principal zona de servicio del bioterio, y su diseño es fundamental para asegurar la eficacia de un buen funcionamiento. Para ello es imprescindible tener en cuenta la cantidad de material a procesar, el equipamiento necesario, y el acceso y separación con otras zonas.

La ventilación debería ser suficiente para eliminar los olores, el exceso de calor y de vapor del resto de la instalación. Los lavatorios para la limpieza de manos y de piezas especiales de equipo son muy útiles, así como también los lavatorios o piletas profundas y grandes. Se pueden colocar autoclaves y otros equipos especiales en esta área. Idealmente, el área de lavado debería ser diseñada para separar el material limpio del sucio. Si el lavado de las jaulas o los estantes de jaulas se hacen por pulverización, se recomienda instalar un sector separado por muros y con agua caliente y fría, además de un distribuidor de desinfectante.

Las plantas técnicas o salas de máquinas son imprescindibles para el funcionamiento de las condiciones controladas de la unidad. Aquí se disponen los equipos pesados como el sistema centralizado de aireación y confort térmico, calderas, grupos electrógenos, compresores, enfriadores, etc. Desde estas zonas es posible acceder al mantenimiento de equipos sin tener necesidad de ingresar a las zonas de barreras donde se encuentran los animales por lo que su disposición respecto de las áreas de animales es fundamental.

Los depósitos son imprescindibles y su tamaño depende de la capacidad total de animales del bioterio. Se necesitan depósitos externos e internos (dentro del área de animales) donde se almacena alimento y el lecho para los animales, y también productos químicos como desinfectantes y otros equipamientos como cajas o jaulas, biberones, etc. Se pueden conservar pequeñas cantidades de alimento y de lecho en las salas de los animales, en recipientes cubiertos que sean apropiados. Para minimizar el deterioro y la contaminación de los alimentos, se tienen que almacenar en cámaras frías, secas a prueba de roedores e insectos.

La falta de espacio de almacenaje es una de las deficiencias más serias y más frecuentes encontradas en el diseño de una instalación. No se debe almacenar equipamiento en los vestíbulos, pasillos o en salas dónde se alojan animales. También el equipamiento limpio, destinado para uso en las salas donde se alojan animales, debería ser trasladado allí solamente cuando se necesite. Las áreas usadas para almacenar equipamiento limpio deben estar separadas de las áreas de recepción del equipamiento sucio

Eliminación de desechos

El área de eliminación de desechos debe proveer espacio para el almacenaje apropiado de material relacionado a los animales, excrementos, camas sucias, etc. Los desechos se deben guardar en una heladera o en una cámara fría reservada para éste fin en caso de que no sean retirados. Los desechos que se depositan afuera de las instalaciones se deben mantener en recipientes cerrados herméticamente. Los bioterios deben cumplir con los reglamentos locales de almacenaje y de eliminación de los desechos. La manipulación de los desechos tóxicos, infecciosos o radioactivos debe cumplir con los reglamentos institucionales y las leyes locales.

Los pasillos son muy importantes ya que además de interconectar las distintas dependencias deben ser anchos para permitir el tránsito y giro de equipos grandes como son las estanterías y sus cajas hacia la zona de servicio.

El diseño debe permitir el sentido de la circulación desde lado más limpio hacia las áreas más sucias. Las salas más frecuentemente usadas por los investigadores deberían ubicarse cerca de la entrada de los bioterios para minimizar la circulación.

Seguridad

El acceso a los bioterios debe ser limitado a fin de asegurar un control constante del ambiente, evitar el ingreso de contaminaciones y para minimizar las interferencias que pueden modificar los resultados experimentales.

Las entradas y salidas deben ser restringidas y los bioterios mantenidos bajo llave o cierres inviolables en todo momento. Solamente el personal autorizado puede tener acceso. Cuando un gran número de investigadores usan las mismas instalaciones, es aconsejable tener cerraduras o claves de acceso individuales para cada sala.

Si es posible se pueden instalar sistemas electrónicos de control de acceso (UFAW, 2010).

Diseño: opciones y ubicación

El planteo de diseños de bioterios abarca desde una unidad nueva, una remodelación de una infraestructura preexistente, hasta el empleo de unidades móviles prefabricadas.

Cada situación requerirá de un análisis previo y del presupuesto disponible para su ejecución y mantenimiento a futuro.

En cuanto a la ubicación del bioterio se deberá analizar si es preferible que esté el edificio aislado junto con sus laboratorios y servicios adicionales, ya que tendrá de esta manera mayor flexibilidad a la hora de pensar en el futuro en una posible expansión de alguna de sus áreas.

Respecto a la edificación en plantas, lo recomendable es disponerlo íntegramente en planta baja para facilitar las operaciones de carga y descarga de materiales e insumos, caso contrario es necesario y más costoso el tráfico en vertical de estos a través de montacargas y/o ascensores.

Respecto a la remodelación de unidades, siempre es más difícil llegar a lograr un buen diseño, porque requiere fundamentalmente de la adaptación a una unidad estructuralmente definida y en general se tienen pocas posibilidades para ampliaciones a futuro, o para cumplir con requisitos especiales como, por ejemplo, determinado nivel de bioseguridad.

Una nueva modalidad es el empleo de unidades móviles prefabricadas, en las cuales se parte de contenedores marítimos y se les da la finalidad de una pequeña unidad experimental, las cuales representan ventajas en cuanto a la ubicación definitiva, menores costos de inversión, y la posibilidad de readaptarlo rápidamente para otro destino.

Características constructivas

“La Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio” (Guide for the care and use of lab animals, 2011) sugiere lo siguiente:

Pisos y desagües

Los pisos deben ser sin ranuras, duraderos, no resbaladizos, estancos al agua y fáciles de desinfectar. Deben estar unidos con las paredes con una curva a fin de eliminar los ángulos agudos.

Deben estar inclinados hacia los desagües y es importante establecer el nivel apropiado de esta pendiente en todas las nuevas construcciones. El grado mínimo de pendiente recomendada para los pisos es de 2.1 cm/m. Se debe prestar una especial atención para asegurar que éste componente crítico de la construcción de los pisos esté adecuadamente efectuado.

Se recomienda que los desagües estén equipados con un mecanismo de descarga de agua que permita mantener un sello de agua limpia (es decir que siempre quede agua limpia en la trampa). Sin embargo, se debe ubicar la descarga de agua en un lugar que no interfiera con la colocación de las jaulas o de los corrales. Los desaguaderos tendrán una rejilla y una trampa móvil para desechos. Su diámetro y los caños de evacuación debe ser por lo menos de 10.5cm donde se evacúan excrementos y restos de lecho. Los desagües de piso destinados para la eliminación de desechos deben estar ubicados al final de la línea principal de drenaje. Se deben verificar regularmente para asegurar su funcionamiento apropiado, su estanqueidad y la ausencia de insectos, además, se deben cubrir y sellar los que no están en uso.

En las salas diseñadas únicamente para alojar especies pequeñas no se necesitan desagües de piso. Como alternativa, se pueden usar sistemas de aspiración de agua que permitan sacar los desechos y limpiar con desinfectantes o con otros productos de limpieza.

Paredes y techos

Las paredes deben ser construidas con materiales impermeables, sin fisuras, tienen que ser sólidas y fáciles para limpiar y desinfectar. Es difícil reducir el ruido con éstos tipos de materiales. No es necesario que las paredes sean tan resistentes como los pisos, con tal que estén protegidas por cenefas o por topes. Las aperturas en los techos y las paredes para los caños de servicio deben ser adecuadamente cerradas y selladas para impedir la entrada de roedores e insectos.

Se recomienda que los techos en todas las salas sean sin juntas ni fisuras, sí con uniones estancas con las paredes. En algunos pasillos, puede ser necesario colocar escotillas en los techos, para permitir el acceso a los sistemas mecánicos. Estos accesos deberán ser hechos con materiales fáciles para desinfectar y que impidan la entrada de roedores en el espacio del techo.

Puertas

Las puertas de los bioterios deben ser diseñadas y construidas para impedir la entrada de roedores. Se prefieren las puertas que cierren solas, de metal o cubiertas de metal, con ventanas de observación que se puedan cerrar. Las dimensiones mínimas recomendadas para las puertas son 107 cm de ancho y 213 cm de alto, para permitir el libre paso de equipamientos.

Ventanas

Las ventanas exteriores complican el control de la temperatura, debido a la radiación y a la conducción que pueden poner en peligro la salud de los animales y los resultados de las investigaciones. También interfieren con el control del fotoperiodo. Si las ventanas ya están instaladas, se deben diseñar o modificar para minimizar los efectos mencionados y para favorecer al máximo la limpieza.

Pasillos

Los pasillos deben estar ubicados estratégicamente para facilitar la circulación prevista en las rutinas de trabajo.

Las normas de diseño para los pisos de pasillos, los desagüados, las uniones paredes/pisos, topes, etc., son las mismas que fueron descritas para las salas de los animales. Los pasillos de tránsito deben ser por lo menos de 182cm de ancho. Los otros pasillos deben ser suficientemente anchos para permitir el movimiento libre del personal y del equipamiento. No se deben fijar objetos protuberantes a menos de una altura de 213 cm y proteger adecuadamente aquellos ya instalados. Los rincones expuestos deben ser protegidos con placas de acero o con otro material resistente. Todos los protectores y dispositivos deben ser sellados para excluir roedores. Los pasillos que llevan a áreas ruidosas deben tener puertas dobles u otro dispositivo contra el ruido.

Servicios

Las cañerías de servicio deben estar instaladas en el piso superior de los bioterios o el espacio sobre el techo de los pasillos, para no tener que hacer el mantenimiento en los locales de alojamiento de los animales. Cada local debe tener agua caliente y fría para el lavado de manos, limpieza y para los bebederos automáticos. Cada sala debe tener por lo menos un sector del servicio eléctrico, que debe ser a prueba de agua, de insectos y de explosiones. Los con-

mutadores y los termostatos se deben diseñar en forma similar. Además, se debe tener acceso a un generador en caso de emergencia.

Control de los factores ambientales

Todos los procesos biológicos en los seres vivos están determinados directa o indirectamente por los factores ambientales. El bienestar y la respuesta fisiológica dependen de ellos. Por tal motivo es fundamental poder estandarizar y controlar estos parámetros dentro de valores aceptables para que los animales encuentren las condiciones óptimas para reproducirse y desarrollarse y que a su vez estos factores no influyan sobre los resultados experimentales (Zuphten F. y col. 1999).

El sistema de climatización HVAC (Calor, ventilación y aire acondicionado)

Un sistema centralizado de climatización HVAC correctamente diseñado y en funcionamiento es esencial para proporcionar el control ambiental y de la presurización del ambiente. El control de la temperatura y humedad que minimice las variaciones debido a condiciones climáticas cambiantes o a las diferencias en el número y tipo de animales y equipos en una sala de animales es esencial. La presurización ayuda en el control de olores y contaminación aerotransportada proporcionando un flujo direccional de aire entre espacios.

Todos los animales compensan las fluctuaciones de temperatura del ambiente a través de comportamientos o respuestas fisiológicas.

Las áreas de cuarentena o de alojamiento de animales expuestos a riesgos biológicos o materiales peligrosos, deben mantenerse bajo presión negativa, mientras que las áreas para cirugía o almacenamiento de equipos limpios bajo presión positiva relativa y con aire limpio (Kacergis JB., 1996).

Los sistemas de climatización deben estar diseñados para brindar confiabilidad (incluyendo redundancia en su caso), facilidad de mantenimiento y conservación de la energía; deben ser capaces de satisfacer los requisitos para los animales; considerar la posibilidad de que sean flexibles y adaptables a los cambios, tipos y números de animales alojados y de mantenimiento sencillo durante la vida útil de la instalación (ASHRAE 2007a). Deben ser capaces de permitir ajustes y lo ideal sería mantener las temperaturas de bulbo seco de ± 1 °C. La humedad relativa debe mantenerse generalmente dentro de un rango de 30 - 70% durante todo el año. Aunque el mantenimiento de la humidificación dentro de un rango limitado durante largos períodos es muy difícil, se deben minimizar las fluctuaciones diarias de la humedad relativa. Si se producen saltos fuera del rango deseado, con variaciones mínimas y de corta duración, es

poco probable que afecten negativamente el bienestar animal. Idealmente la humedad relativa se debe mantener dentro del rango de +/- 10% del punto óptimo ajustado.

Estos sistemas integrales pueden estar diseñados para manejarse dentro de volúmenes constantes de aireación, que es lo que más se emplea generalmente, pero también existen sistemas que se pueden ajustar a volúmenes variables de aireación y carga de animales, lo cual ofrece mejores posibilidades en cuanto a la flexibilidad y conservación de energía.

Los rangos especificados previamente de temperatura y humedad, se deben poder modificar para satisfacer las necesidades de los animales en circunstancias especiales, incluso cuando los requisitos ambientales sean para mantener animales de similares requerimientos en toda la instalación. Es muy probable que se necesite modificar estos valores cuando los animales se mantienen en algunos recintos primarios, tales como jaulas aisladoras u otros alojamientos, donde temperatura y humedad pueden superar los niveles de la sala. Los controladores de temperatura deben estar ubicados en cada sala de animales ya que puede haber variaciones de temperatura debido a las diferencias en las densidades animales y ganancia de calor o pérdidas en los conductos de ventilación y otras superficies (Clough H., 1982).

La humidificación por lo general es controlada y complementada por el este sistema integral. La mayoría de los sistemas HVAC están diseñados para temperaturas y humedades media, bajas y altas experimentados en un área geográfica y dentro de $\pm 5\%$ variación (ASHRAE 2009). Las fluctuaciones moderadas en temperatura y humedad relativa fuera de los rangos sugeridos generalmente son bien toleradas por la mayoría especies más usadas en la investigación si son breves y poco frecuentes.

Debe prestarse especial atención a tomar medidas que reduzcan al mínimo las fluctuaciones en temperatura y humedad relativa fuera de los rangos recomendados debido a condiciones extremas en el medio ambiente externo. Tales medidas pueden incluir redundancia parcial, recirculación parcial del aire, índices de ventilación alterada o el uso de equipos auxiliares. En caso de una falla del sistema o componente HVAC, los sistemas deben mínimamente suministrar las necesidades de instalaciones en un nivel reducido, frente a los efectos adversos de la pérdida de control de la temperatura y, en su caso, mantener los gradientes de presión crítica. Es esencial prevenir pérdida o acumulación de calor potencialmente mortal durante fallas mecánicas. Generalmente pueden atender las necesidades temporales para la ventilación de las instalaciones al aire libre o protegidas con equipos auxiliares.

Los accesos de entrada del sistema de tratamiento de aire deben evitar el arrastre de partículas de humos de vehículos, equipos y del sistema de extracción. Mientras que lo usual es emplear 100% aire exterior, cuando se utiliza el aire recirculado para mantener su calidad debe ser filtrado. El tipo y eficiencia de la inyección y extracción de aire tratado deben corresponderse con la cantidad y tipos de contaminantes y los riesgos que poseen. El suministro de aire se filtra generalmente con filtros con un 85 – 95% de eficiencia (ASHRAE 2008). En ciertos casos, pueden instalarse filtros de eficiencia más alto 99.99% (p. ej., HEPA) y pueden ser beneficiosos

en sistemas de aire recirculado y aire suministrado para o extraído de ámbitos especializados como áreas quirúrgicas y las instalaciones de biocontención (Kowalski y col. 2002).

Energía e iluminación

El sistema de energía eléctrica debe ser seguro y proporcionar la iluminación apropiada, tener un suficiente número de tomas corriente, y un amperaje adecuado para la alimentación de algún equipo especial. Cuando ocurra alguna falla, debe estar disponible un suministro alternativo de energía eléctrica, que puede ser un grupo electrógeno, para mantener el sistema HVAC y de racks ventilados, freezers, y demás equipos importantes de las diversas áreas. Es importante poder contar con un sistema de transferencia automática para asegurar el suministro de energía en caso de cortes durante la noche o los fines de semana.

Los accesorios de iluminación, tomas corrientes, y llaves de interrupción, deben estar selladas apropiadamente para prevenir el acceso de organismos indeseados.

Generalmente en los bioterios se utilizan tubos fluorescentes empotrados, con un espectro de tipo luz día, y regulados por relojes automáticos para asegurar un fotoperiodo adecuado a cada especie. Pueden considerarse también sistemas con dos niveles de iluminación cuando se alojan especies sensibles a altas intensidades de iluminación como es el caso de roedores albinos, pudiendo emplearse bajas intensidades de iluminación durante la fase diurna del ciclo y altas intensidades para alguna maniobra que necesite realizar el personal.

Se recomienda emplear interruptores y tomas corriente con protección anti humedad para aquellas zonas de mucho uso de agua como áreas de lavado o de mantenimiento de acuarios.

Control de ruidos

Es uno de los aspectos más importantes que debe tenerse en cuenta en el diseño o remodelación de los bioterios. Las áreas generadoras de ruidos, tales como las áreas de lavado y salas de máquinas deben estar separadas y aisladas acústicamente de las zonas de experimentación y alojamiento de animales. Las paredes tradicionales de albañilería, debido a su densidad son buenas aislantes del ruido, pero igualmente se pueden emplear diferentes materiales atenuantes de ruidos sobre paredes y cielorrasos, siempre y cuando se puedan limpiar y desinfectar y eviten que puedan albergar microorganismos o insectos. La experiencia demuestra que las puertas de corredores bien logradas, y los accesos con doble puerta, pueden ayudar a controlar la transmisión de sonidos a lo largo de los pasillos.

Los sistemas de alarma deberán emplazarse y posicionarse teniendo en cuenta que no perturben a los animales. Es recomendable elegir sistemas de alarma que no generen sonidos en el rango de ultra sonido, nivel al que son sensibles la mayoría de los roedores (Heine W., 1998).

Control de Vibraciones

Las vibraciones pueden surgir de equipos mecánicos, eléctricos y otros componentes del edificio, o de fuentes remotas a través del piso. Con respecto a la consideración de esto último, debería dotarse al edificio de materiales de aislamiento, sobre todo si el bioterio está situado encima, debajo o adyacente a aeropuertos, subterráneos, trenes o tráfico de automóviles y camiones. Muchas especies pueden ser afectadas por vibraciones de diferentes frecuencias y longitudes de onda, por lo que se debe intentar identificar todas las fuentes de donde provienen y aislar con sistemas de supresión de vibración (ASHRAE 2007b).

Planta técnica y equipamiento

Los sistemas de calefacción, de aire acondicionado y de ventilación para bioterios son generalmente muy sofisticados y costosos. La ubicación de estos sistemas debe permitir que su mantenimiento se efectúe con un mínimo de perturbación para los animales. Esto se puede conseguir mediante la instalación de los servicios mecánicos en un entrepiso técnico, que es el espacio que se encuentra entre el techo y el cielorraso o sobre el techo de losa del edificio, al cual puede acceder fácilmente el personal de mantenimiento y de esta forma no entrar en el bioterio. Sin embargo, es más común ubicar los sistemas mecánicos en el espacio entre pisos. En este caso, el acceso a los sistemas mecánicos se debe hacer desde los pasillos, y no desde las salas de los animales o de las zonas restringidas tales como en las áreas de riesgos biológicos (Ruiz Rodríguez y col., 2006).

Referencias

- ASHRAE Addenda. 2007^a. Energy standard for building except low rise residential buildings. American Association for Heating, Refrigerating, and Air-Conditioning Engineers, Inc. ISSN 1041 2336
- ASHRAE 2007^b. Addenda. 2007^a. Energy standard for building except low rise residential buildings. American Association for Heating, Refrigerating, and Air-Conditioning Engineers, Inc. ISSN 1041 2336.
- ASHRAE. 2009. Handbook Fundamentals. Inch Pound Edition.
- Botet J, Moia E, Pi R. 2003. Salas limpias. Normativa aplicable y clasificación. Cualificación y monitorización. Farmacéutica N° 103.
- Canadian Council for Animal Care (CCAC). 2003. Guideline on laboratory animal facilities. Characteristics, design and development. ISBN: 0-919087 - 41 - 8.
- Clough G. 1982. Environmental effects on animal used in biomedical research. Biol Rev Camb Philos Soc. Aug; 57(pt 3): 487 – 523.

- Guide for the care and use of laboratory animals. 2011. Eighth edition. Institute for Laboratory Animal Research. The National Academy Press Washington DC.
- Heine, W. 1998. Environmental Management in Laboratory Animal Units. PABST Science Publishers.
- Kacergis JB, Jones RB, Reeb CK, et al. 1996. Air quality in a animal facility: particulates, ammonia, and volatile organic compounds. American Industrial hygiene Association Journal 57 (7): 634-640.
- Kowalski WJ, Bahn \square eth WP and Carey DD. 2002. Engineering control of airborne disease transmission in animal laboratories. Contemporary Topics in Laboratory Animal Science 41: 9–17.
- Real Decreto 1201/2005 sobre animales utilizados en experimentación y otros fines científicos. Recomendación de la Comisión Europea de 18 de junio de 2007 sobre las líneas directrices relativas al alojamiento y cuidado de los animales utilizados para investigación y otros fines científicos. 2007/226/CE.
- Ruiz Rodríguez M. Ballesteros J. 2006. Equipos asociados a salas limpias. SAS y duchas de aire. Cherp. Industria Farmacéutica N° XX.
- The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals. 2010. Eight Edition. Wiley – Blackwell ed.
- Zutphen, L. F. M. van, ed. lit.; Baumans, Vera, ed. lit.; Beynen, A. C., d. lit.; Zúñiga, Jesús M., ed. lit.; 1999. Principios de la Ciencia del Animal de Laboratorio Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio, ed.
- Vivarium Design Policy and Guidelines, NIH. 1996. Texto de referencia del Instituto nacional de salud de Estados Unidos para el diseño y construcción de bioterios.

CAPÍTULO 6

Estandarización de las condiciones ambientales y de alojamiento. Macro y microambiente

Silvana Nora Milocco y María del Pilar Cagliada

Las instalaciones para el cuidado y uso de animales, ya sea en investigación, enseñanza y pruebas, deben favorecer su bienestar y seguridad; asimismo debe proporcionar un lugar de trabajo seguro y con un diseño adecuado para el personal, estableciendo un entorno de investigación sólido (CCAC, 2003). La estandarización de las condiciones ambientales, se logra a través de un buen programa de manejo del ambiente, alojamiento y cuidado, permitiendo a los animales crecer, madurar, reproducirse y mantener una buena salud, de modo que sus patrones metabólicos y de comportamiento se mantengan normales y estables, proporcionando resultados confiables.

Para establecer un ambiente físico y social adecuado, deben considerarse muchos factores (INTA, 2010), entre ellos:

- La especie, variedad y raza de animales y sus características individuales, tales como sexo, edad, tamaño, conducta, experiencia y salud.
- La habilidad de los animales para integrar grupos con sus semejantes, a través de la vista, olfato y posible contacto, ya sea que los animales se mantengan aislados o en grupos.
- El diseño y construcción del alojamiento.
- La disponibilidad y adecuación de elementos que enriquezcan el medio ambiente.
- Las metas del proyecto y el diseño experimental (ej., producción, crianza, investigación, pruebas de laboratorio y educación).
- La intensidad de la manipulación animal y el grado de daño que causen los procedimientos.
- La presencia de materiales peligrosos o que causen enfermedad.
- La duración del período de permanencia de los animales.

El ambiente de los animales presenta tres aspectos fundamentales a tener en cuenta: el ambiente estructural (el edificio propiamente dicho), el ambiente físico (el lugar donde se alojarán los animales) y el ambiente social (relacionado con el comportamiento que van a tener los animales en dicho lugar).

Las variables ambientales influyen directa o indirectamente sobre todos los procesos biológicos y ejercen efecto sobre el bienestar y la respuesta fisiológica. Por consiguiente, al realizar una experiencia, es muy importante conocer los requerimientos fisiológicos y etoló-

gicos de la especie que se va a mantener y producir en el bioterio. Si los animales se encuentran en un estado de disconfort, el estrés va a producir, inevitablemente, alteraciones en los resultados de las pruebas.

El ambiente se puede dividir en dos grandes grupos, el microambiente y el macroambiente, cada uno con sus componentes propios; pero en algunas especies esta división no es tan marcada y los elementos de ambos están integrados. Un ejemplo claro se observa en el ambiente de los peces cebra y en los animales de granja.

Microambiente

También llamado confinamiento primario, es el espacio físico que rodea de manera inmediata a los animales. Tiene su propia temperatura, humedad y composición del aire. Debe reunir determinadas condiciones para asegurar el bienestar de los animales que allí se alojen, a saber:

- Permitir el comportamiento normal de los animales. Esto es algo complicado de lograr en un bioterio, sobre todo cuando se trabaja con roedores, ya que es difícil recrear su ambiente natural.
- Permitir la interacción social y el desarrollo de jerarquías dentro y entre las cajas, jaulas, corrales, caniles, gatiles.
- Los animales deben permanecer limpios y secos, esto se logra si el recinto permite una fácil higiene.
- Debe tener una ventilación adecuada.
- Permitir que los animales tengan fácil acceso al agua de bebida y alimento.
- Debe ser seguro para impedir el escape de los animales o que entren animales salvajes
- Sin superficies filosas que puedan lastimarlos. Cabe recordar que tanto la rata como el ratón son roedores con incisivos de crecimiento continuo, y al roer las cajas, crean bordes cortantes.
- En general, se aconseja que el lugar de alojamiento permita la observación de los animales. De esta manera, se puede evaluar el comportamiento, si consumen el alimento, si se producen peleas, si están enfermos o si se produjo la muerte de algún animal. Son los técnicos y/o cuidadores los que más información nos pueden brindar sobre estos datos, ya que están en contacto permanente y directo con los animales; por este motivo, es fundamental tener una estrecha comunicación con ellos.
- Controlar las condiciones microambientales es importante porque cualquier cambio producen alteraciones en los procesos biológicos y metabólicos, y hacerlos más vulnerables a diferentes enfermedades. Las mediciones de las características del microambiente se pueden realizar con equipos o mediante programas informáticos. Hasta el momento, todos los datos recabados han demostrado que la temperatura, humedad y concentración de gases es mucho mayor aquí que en el macroambiente.

Los factores que componen el microambiente son: las cajas, jaulas, corrales, caniles, gatiles; el lecho; el agua de bebida; el alimento; y la densidad animal.

Cajas o jaulas

Es el medio donde se van a desenvolver los animales. Normalmente, dividen su espacio en cuatro sectores: un sector donde eliminan, otro donde comen, otro sector donde descansan y un área para desarrollar actividades lúdicas. También se les debe proporcionar un lugar adicional para estar en solitario, por si así lo desean. Puede ser una caja, una lata o una pared divisoria que les permita algo de privacidad.

Las cajas deben ser confortables, higiénicas, de fácil limpieza, deben brindar fácil acceso al alimento y al agua de bebida, con una ventilación y tamaño apropiados. Deben fabricarse con materiales resistentes, ya que estarán sometidas continuamente a lavados y manipulación. Deben ser atóxicas, de material anticorrosivo y resistente para poder autoclavarlas, aislantes y de ser posible transparentes para observar el comportamiento. Para los pequeños roedores se utilizan las cajas tipo “*shoe box*” o cajas de zapatos, de policarbonato o polipropileno o acero inoxidable. Estas últimas son más durables, pero tienen la desventaja de ser muy ruidosas, y su peso dificulta las tareas del operador. El diseño debe ser simple, facilitando la introducción del alimento y la mamadera con el agua de bebida. Para ratas también existen cajas con una tapa que tiene una rejilla superior más elevada para que pueda ver hacia el exterior. Con frecuencia los roedores se hospedan en jaulas sobre pisos de alambre mejorando la higiene de las jaulas, permitiendo el paso de las heces y orina, las cuales se depositan en una bandeja colocada debajo. Sin embargo, algunas evidencias sugieren que los alojamientos sobre piso sólido y material de cama son los preferidos de los roedores (Ortman J. A., 1983). Además, las jaulas para ratas presentan la desventaja que solo se les cambia la bandeja inferior, por lo que los animales no están habituados al manejo y a la hora de manipularlas, el experimentador puede tener dificultades.

Corrales, caniles, gatiles

En otras especies, como por ejemplo el cerdo, los pisos deben ser de materiales duros, aislantes, resinas de poliéster, caucho sintético. Pueden tener perforaciones, un declive de 5° y buenos desagües para facilitar la limpieza. El perro se aloja en caniles, los cuales deben tener una zona de recreación al aire libre. Los gatiles deben ofrecer todo tipo de enriquecimiento ambiental, como pasadizos, arboles artificiales, estantes, o perchas, para que los gatos desarrollen su comportamiento normalmente.

Estantes convencionales

Las cajas o jaulas pueden colocarse en estantes convencionales, es aconsejable que sean de acero inoxidable para su mejor desinfección y con ruedas para facilitar la limpieza de la habitación. Con una altura máxima de 170 centímetros. Se aconseja no colocar cajas en el estante superior para que la luz no incida directamente sobre ellas. El ancho puede ser variable, esto depende de la especie a alojar y del espacio de la sala. Estas estanterías tienen la ventaja de permitir colocar distintos tipos de cajas o jaulas.

Cabinas ventiladas

Otra opción, es ubicar las cajas o jaulas en cabinas ventiladas. Estas cabinas, en general de acero inoxidable, presentan cubículos, con filtración individual absoluta en cada uno de ellos, con presión positiva o negativa, dependiendo del ensayo. Las hay de diferentes tamaños, permitiendo alojar diferentes tipos de cajas y/o jaulas. Tienen como desventaja que necesitan de una estación de cambio auxiliar o de un flujo laminar para realizar el cambio de lecho y caja de los animales.

Estantes con ventilación individual o racks ventilados

La alternativa más moderna es la utilización de los racks ventilados. Son de acero inoxidable y de tamaño variable. Tienen filtración absoluta de aire en cada caja, lo que nos permite tener varias experiencias con diferentes animales o especies al mismo tiempo. Al igual que las cabinas necesitan una estación de recambio auxiliar y pueden actuar tanto con presión positiva como negativa. Se puede acoplar más de un rack en el mismo módulo de control. La desventaja es que son muy costosos y permiten alojar cajas de una sola marca. Las cajas tienen además de la rejilla otra tapa superior con filtro. Existen racks ventilados para alojar peces cebra.

Microaisladores

Los microaisladores son cajas, generalmente de polipropileno y/o policarbonato, transparentes, en su parte superior tienen una reja de acero inoxidable y una tapa con filtro. Permiten alojar pocos animales en estudios de corta duración, generalmente no más de tres meses. De esta forma, los animales mantienen su condición sanitaria durante todo el ensayo. Es necesaria una estación de cambio auxiliar o realizar estos procedimientos bajo un flujo laminar. También son muy útiles para transportar animales entre áreas de producción y laboratorios o dentro de una misma Institución.

Lecho o cama para cajas o jaulas

El material del lecho de los animales es un factor del medio ambiente que se puede controlar, e influye directamente en el bienestar animal y por lo tanto, en los resultados experimenta-

les. Se utiliza para absorber, diluir y/o limitar el contacto del animal con sus excrementos y para la construcción de nidos. Proporciona aislamiento, permitiendo que el animal regule su temperatura; puede servir para proporcionar enriquecimiento ambiental; minimiza el crecimiento de microorganismos; y en algunos casos, reduce la acumulación de amoníaco dentro de la jaula. El lecho puede ser con o sin contacto. Por definición, el lecho de contacto es aquel que tiene relación directa con los animales. El lecho sin contacto se proporciona como una sábana o un rollo, y se coloca debajo de una rejilla o de la jaula para recolectar y absorber la orina y las heces, normalmente no entra en contacto físico con el animal.

Se utiliza una gran variedad de materiales, la selección del lecho debe basarse en diversos factores, tales como la preferencia de los animales. Por ejemplo, los ratones muestran predilección por materiales fibrosos, que pueden manipular y les permite construir un nido. Los cerdos buscan y exploran naturalmente, incluso cuando no hay estímulos obvios, por lo que, si se les proporciona un lecho, debe ser de naturaleza tal, que aliente y satisfaga ese comportamiento. En ratones desnudos o sin pelo que carecen de pestañas, las fibras de algunas formas de lecho de celulosa pueden provocar abscesos periorbitarios (Carter R. y col. 2018). Otras consideraciones para la selección de la cama son el costo del producto; disponibilidad; absorción; palatabilidad o falta de ella; facilidad de manipulación, transporte y almacenamiento, incluido el embalaje y el peso del producto (seco y húmedo); la capacidad de esterilizar y/u obtener productos irradiados con rayos gamma; la capacidad de controlar la acumulación de amoníaco; y la cantidad de polvo asociado. No hay un lecho ideal para todas las especies.

Los métodos de fabricación, monitoreo y almacenamiento del lecho por parte de los proveedores son importantes, ya que puede estar contaminado con toxinas y contaminantes ambientales, así como con bacterias, hongos y parásitos (NRC, 2011). El lecho no se debe colocar sobre el piso durante el transporte y almacenamiento sino en tarimas, estantes o carros, de tal manera que se preserve su calidad y se reduzca al mínimo la contaminación. Durante la esterilización en autoclave la cama puede absorber humedad, resultando en una menor capacidad de absorción y favoreciendo el crecimiento de microorganismos; por lo tanto, se deben dar los tiempos de secado y las condiciones de almacenaje apropiadas.

La cantidad de lecho que se coloca en la caja o jaula debe ser suficiente para que los animales se mantengan secos durante el lapso comprendido entre los cambios, y para que el animal pueda expresar su repertorio natural de conductas como excavación, forrajeo, formación de madriguera y nido. En el caso de los pequeños roedores de laboratorio, hay que observar que los picos de los bebederos no toquen el lecho, porque esto causa derrame de agua dentro de la jaula. También debe tener una capacidad de absorción adecuada, ya que, si es muy absorbente, puede provocar la deshidratación de las crías, como sucede en el caso de los roedores y los conejos los cuales nacen sin pelo y muy poco desarrollados. Y por el contrario si son hidrofóbicas, los animales van a estar húmedos, aumentando su estrés y alterando el bienestar.

Tipos de lecho

La cama, generalmente, se fabrica a partir de materiales vegetales como la madera, el algodón y la mazorca de maíz, que están sujetos a diversos grados de procesamiento.

Madera

La viruta de madera blanca es el material de contacto más utilizado, aunque su uso, sin tratamiento, está contraindicado en algunos protocolos, debido a que puede afectar el metabolismo animal (Davey A. K. y col. 2003). No se recomiendan las virutas de cedro porque presentan hidrocarburos aromáticos inductores de las enzimas microsomales hepáticas y además son citotóxicas (Torrönen y col. 1989) y se ha reportado que aumentan la incidencia de cáncer (Jacobs y col. 1978). Para reducir la concentración de hidrocarburos aromáticos y prevenir este problema se ha usado el tratamiento con calor, previo a su utilización. Hay que evitar el uso de viruta de maderas que al mojarse tiñan a los animales, ya que esto provoca peleas; tampoco deben despedir aromas que enmascaren los olores naturales. La más aceptable es la viruta de álamo.

Marlo

El marlo o mazorca de maíz, se produce a partir del centro leñoso de la mazorca. Se procesa en un molino, posteriormente se seca, y está disponible en varios tamaños de granulación. Este material inhibe la acumulación de amoníaco, pero esta característica no está relacionada con su capacidad de absorción. La mazorca de maíz puede ser abrasiva y se ha asociado con lesiones en las patas en cepas de ratones inmunodeprimidos. También se ha observado la liberación de ácido acético en forma de gas, presumiblemente por la descomposición de la materia orgánica residual. La densidad de la mazorca de maíz limita la construcción de nidos y, por lo tanto, se debe complementar con material para la nidificación o mezclar con otros tipos de camas. Se recomienda esterilizar en autoclave o comprarlo irradiado, ya que la porosidad de la mazorca de maíz conduce al crecimiento de moho en el producto no esterilizado o no irradiado. La mazorca de maíz se expande y se adhiere durante el autoclavado, lo que requiere la necesidad de disociar los gránulos después de la esterilización con vapor (Carter R. y col. 2018).

Celulosa

Una variedad de productos de madera procesada, por ejemplo, celulosa tanto virgen como reciclada, se utilizan como lecho de contacto y sin contacto. Los productos difieren en capacidad de absorción, color, forma y tamaño. También se pueden mezclar con otros productos, como el marlo. Los lechos de celulosa son más caros que la madera y generalmente son ideales para la construcción de nidos. Hay una gran variedad de productos fabricados a partir de la celulosa, utilizados como cama sin contacto. Estos incluyen al papel absorbente con respaldo de plástico y al cartón corrugado. Se comercializan en hojas pre cortadas, con forma de bandeja y en rollo. El material utilizado para la cama sin contacto se puede impregnar con antibióti-

cos, por ejemplo, neomicina, para inhibir el crecimiento bacteriano y la posterior producción de amoníaco (Carter R. y col. 2018).

Agua de bebida

Se administra en mamaderas con un pico especial de acero inoxidable. Las botellas de agua siguen siendo la mejor opción para el suministro de agua para los animales de laboratorio. Se fabrican comercialmente en varios tamaños y materiales, tales como el vidrio y distintos polímeros plásticos. Deben ser resistentes a productos químicos desinfectantes y al proceso de esterilización con vapor.

El vidrio se usa desde hace mucho tiempo en la industria, presenta la desventaja de ser pesado en comparación con los polímeros plásticos, y debido a las frecuentes roturas se producen lesiones en el personal. Se ha demostrado que, en determinadas circunstancias, las botellas de vidrio aportan silicio al agua potable, introduciendo una nueva variable en las investigaciones.

Las botellas de tipo polímero ofrecen la ventaja de ser livianas, duraderas, transparentes y resistentes al calor y a la degradación química. Se comercializan en diversos volúmenes y formas, que se adaptan a las distintas especies de animales de laboratorio. Aunque las botellas de polímero ofrecen muchas ventajas, un tipo de polímero plástico, el policarbonato, se ha asociado con la liberación de bisfenol A (Howdeshell K. L. y col. 2003), un compuesto orgánico sintético utilizado en la producción de policarbonatos y otros termoplásticos. El bisfenol A y análogos, bisfenol S y bisfenol F, se caracterizan por ser disruptores endócrinos y exhiben propiedades similares a la de los estrógenos. Por el contrario, el polipropileno, polietileno y tereftalato de polietileno (PET) no se fabrican con bisfenoles u otros disruptores endócrinos conocidos, lo que sugiere que estos materiales representan una alternativa viable. La introducción de disruptores endócrinos a través del suministro de agua, puede agregar una variable a la investigación y quizás perturbar los ciclos normales de reproducción (Allen E. D. y col. 2018).

Los tapones o tapas están disponibles en una amplia gama de materiales. Los tapones de caucho y neopreno negros son los tipos predominantes. De estos dos, el neopreno es más resistente a la degradación causada a los ciclos repetitivos de esterilización con vapor; sin embargo, el endurecimiento de los tapones, ocurre con ambos tipos. Esto puede provocar la descomposición y la liberación de partículas del tapón al agua potable. En última instancia, estas partículas serán consumidas por los animales con consecuencias potencialmente negativas. También se sabe que los tapones de caucho y neopreno liberan minerales y metales pesados al agua (Nunamaker y col. 2013).

Hay que asegurarse que el pico de la mamadera no se tape, ya que la falta de agua luego de dos o tres días puede provocar la muerte del animal. Se recomienda reemplazar las botellas por otras limpias y con agua fresca, antes que rellenarlas, con el fin de evitar contaminaciones

microbiológicas. Cada caja tiene su modelo particular de mamadera. Cuando se deben transportar los animales, el agua se coloca en forma de gelatina consistente, o frutas (manzana, mandarinas, naranjas), o un trozo de papa.

La esterilización con vapor es uno de los métodos más antiguos y eficaces para tratar el agua potable de los animales de laboratorio. En condiciones apropiadas, la esterilización con vapor destruye todos los microorganismos presentes en el medio acuático, incluidos virus, bacterias, esporas, hongos, mohos y protozoos.

El uso de compuestos de cloro para tratar el agua potable de los animales es un medio de desinfección eficaz y aceptable. Estos compuestos preservan la calidad del agua al evitar que microorganismos sensibles al cloro colonicen el sistema de distribución de agua. Incluso tienen efecto antimicrobiano a concentraciones bajas.

Hay muchos compuestos de cloro disponibles para tratar los suministros de agua potable. Las cloraminas, el hipoclorito de sodio (NaOCl) y el dióxido de cloro (ClO₂) se encuentran entre los compuestos más utilizados. En concentraciones correctas, los compuestos de cloro son seguros para el consumo humano y animal (Allen E. D. y col. 2018).

El ácido inorgánico se ha utilizado durante mucho tiempo en los sistemas de agua potable de los animales de laboratorio como medio para controlar la contaminación bacteriana. El agua acidificada ha sido particularmente eficaz para eliminar patógenos oportunistas gramnegativos como *Pseudomonas aeruginosa*, un organismo común que se encuentra en los suministros de agua domésticos. Aunque son eficaces contra *P. aeruginosa* y otras bacterias Gram negativas, algunos microorganismos (por ejemplo, hongos resistentes a los ácidos) pueden no verse afectados y sobrevivir.

El ácido clorhídrico es el más utilizado, aunque el ácido sulfúrico constituye una opción eficaz. Un pH de entre 2,5 y 3,0 es la concentración de ácido recomendada. Se ha demostrado que un pH por debajo de 2,5 afecta las ganancias de peso y el consumo de agua en ratones machos. El uso de agua acidificada puede tener algunos efectos secundarios en la investigación, los cuales deben considerarse antes de su uso. En algunos casos, el agua acidificada puede reaccionar con los tapones de las botellas de agua y liberar sustancias indeseables. También se ha demostrado que altera el microbioma intestinal y la incidencia y la tasa de aparición de la diabetes (Allen E. D. y col. 2018).

Alimento

El suministro de alimentos de alta calidad es esencial para satisfacer las necesidades fisiológicas de los animales, específicamente el crecimiento, el mantenimiento y la reproducción. Existen numerosos productos, que difieren en el contenido de nutrientes, disponibles en varias formulaciones. Una directiva principal al formular piensos es garantizar un contenido suficiente de agua, carbohidratos, grasas (lípidos), proteínas, minerales y vitaminas. Si bien todos los animales requieren cada una de estas seis clases de nutrientes, algunas especies pueden re-

querir niveles más altos de algunos que otros. Se debe tener en cuenta que los nutrientes esenciales son aquellos que un animal no puede sintetizar o no sintetiza en cantidades suficientes para mantenerse sanos, por lo que deben obtenerse de una fuente externa, es decir, en la dieta. Es importante reconocer, al seleccionar una dieta, que un nutriente en particular puede ser esencial (es decir, necesario en la dieta o proporcionado de otra manera) para algunas especies, pero no para otras. Los nutrientes no esenciales son aquellos que son producidos por el animal o su flora microbiana (Carter R. y col. 2018).

Debe ser palatable y digestible. Libre de harina de pecado, aditivos, drogas, hormonas, antibióticos, pesticidas y contaminantes; todos estos agregados interfieren en los resultados de las pruebas. En roedores se administra *ad libitum*. Se debe conocer su composición, fecha de elaboración y fecha de vencimiento. Lo ideal es consumirlo antes de cumplirse los 3 meses de su producción. Las bolsas deben estar intactas durante su almacenamiento, sin roturas ni mofaduras o humedad. No deben almacenarse sobre el piso directamente y debe controlarse el ingreso de roedores salvajes u otros vectores de enfermedades al depósito de alimento. El alimento puede ser irradiado (radiación γ) y reforzado con un antioxidante para evitar que se enrancie. O puede ser esterilizado en autoclave y reforzado con vitaminas, ya que algunas se degradan con el calor. También el autoclavado puede afectar la palatabilidad y dureza de los pellets. En cada sala, se suele tener un contenedor con una pequeña reserva de alimento: se recomienda no intercambiar esos recipientes entre salas ni trasladarlos por los pasillos para evitar contaminaciones.

Y lo ideal es tener un certificado con el análisis químico y microbiológico de cada lote o partida. Debe cuidarse al máximo sus condiciones de transporte, de almacenamiento, la manipulación y el tratamiento que se le da antes de aportárselo a los animales. El alimento en forma de pellets debe tener la consistencia adecuada para que el animal pueda consumirlo y que no se desperdicie.

Densidad animal

Es el número de animales por caja o jaula. Debe responder a las recomendaciones internacionales. La cantidad de animales a colocar en una caja o jaula depende de su tamaño corporal, edad, estado pre y post natal, evitando el hacinamiento. Cada animal debe disponer de un espacio mínimo, suficiente para moverse y expresar las posturas normales de conducta y sociabilidad. Debe tener fácil acceso al agua y alimento y disponer de un área suficiente con lecho limpio y sin obstáculos para moverse y descansar (**Tabla 1**).

Animales	Peso corporal (g)	Área de piso/Animal cm²	Altura^a cm
Ratones	< 10	38,71	12,7
	Hasta 15	51,61	12,7
	Hasta 25	77,42	12,7
	> 25 ^b	96,77	12,7
Ratas	< 100	109,68	17,78
	Hasta 200	148,39	17,78
	Hasta 300	187,1	17,78
	Hasta 400	258,1	17,78
	Hasta 500	387,1	17,78
	> 500 ^b	451,61	17,78
Hámsteres	< 60	64,52	15,24
	Hasta 80	83,87	15,24
	Hasta 100	103,23	15,24
	> 100 ^b	122,58	15,24
Cobayos	≤ 350	387,1	17,78
	> 350 ^b	651,6	17,78
a. De piso a techo de la jaula. b Los animales más grandes pueden requerir más espacio para satisfacer los estándares de rendimiento (vea el texto)			

Tabla 1. Espacio recomendado para roedores de laboratorio alojados en grupo.
 Fuente: *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Research Council.*

Macroambiente

Es el ambiente físico o espacio secundario que contiene el conjunto de cajas, jaulas, corrales, gátiles o caniles.

Los factores que componen el macroambiente son: la temperatura, la humedad, la iluminación, la ventilación, los ruidos y los olores. La alteración de estos factores producirá cambios en el modelo animal y con ello, la modificación del tipo de respuesta, y aumento de la variabilidad de los resultados entre o dentro de los laboratorios de experimentación.

Temperatura y humedad

Estos parámetros deben fluctuar dentro de un rango estrecho, de acuerdo con la especie y la cepa. Por ejemplo, para ratones la temperatura adecuada es entre 20 a 25°C y la humedad entre 40 y 70 %. El mantenimiento de la temperatura corporal dentro de los límites de la variación normal es esencial para el bienestar de los homeotermos. Generalmente la exposición de los animales no adaptados a temperaturas superiores a los 29.4°C o por debajo de 4.4°C, sin que tengan acceso a protección en un refugio u otro mecanismo, producen efectos clínicos, que pueden poner en peligro su vida. Los animales se pueden adaptar a condiciones extremas mediante mecanismos morfológicos, fisiológicos y de conducta, pero tales adaptaciones llevan tiempo y pueden alterar los resultados experimentales o afectar los rendimientos (CCAC, 2003).

Los cambios de temperatura producen cambios en el metabolismo, en la circulación periférica, en la actividad y comportamiento de los animales. Al producirse variaciones en la ingesta, se producen cambios en las pruebas de captación de sustancias, así como en la actividad de esas sustancias. Además, interfieren en la lactancia, gestación y espermatogénesis. En general, los roedores soportan mejor las bajas temperaturas que las altas, por encima de los 32°C puede producirles la muerte. Esto se debe a que los roedores tienen mayor dificultad para disipar el calor, puesto que carecen de glándulas sudoríparas, no jadean y tienen casi toda su superficie corporal cubierta de pelos. Disipan el calor a través de la cola, mojan su cuerpo con saliva, y en la naturaleza cavan pozos. Las ratas cuando se encuentran en ambientes fríos producen menor cantidad de ácido ascórbico, por lo que se aconseja suministrarles vitamina C (Salvador Cabos N. 2001).

La temperatura de la sala también puede variar de acuerdo a la densidad animal, equipos que estén en funcionamiento y por la cantidad de personas y el tiempo que ellas se encuentren trabajando en la sala.

La humedad relativa (HR) es otro componente del macroambiente que podría tener efectos perjudiciales sobre la salud animal si no se mantiene dentro de rangos tolerables. Si bien existe un rango más amplio de control de la humedad (30% -70%) que la temperatura, se deben evitar las variaciones extremas (NRC 2011). Estos valores se basan en rangos tolerables para la mayoría de las especies de mamíferos, es fundamental determinar cuál es el rango ideal para la especie utilizada en la investigación biomédica. Se ha demostrado que las fluctuaciones extremas impiden la tasa de pérdida de calor de un animal, afectan la actividad normal y provocan cambios en las cantidades normales de ingesta de alimentos (NRC 2011). Ciertas especies pueden desarrollar dermatitis o piel escamosa, y las ratas y ratones pueden desarrollar cola anillada o *ring-tail*, por períodos prolongados de exposición a humedad por debajo del 30%. La HR extremadamente alta también puede influir en las condiciones del microambiente, como el aumento de los niveles de humedad en la cama, la condensación de la pared de la jaula, las temperaturas más altas de la jaula, el deterioro de los alimentos y la generación bacteriana de

amoníaco, esto último puede ser responsable de procesos patológicos del tracto respiratorio (Salvador Cabos N. 2001).

Teniendo en cuenta las derivaciones ocasionadas por la falta de control del ambiente, la temperatura y la humedad deben monitorearse y registrarse de manera regular. Un equipo tan simple como un higrotermómetro en cada sala o un sofisticado sistema electrónico de monitoreo ambiental en toda la instalación puede garantizar que los animales no estén sujetos a períodos prolongados de fluctuaciones extremas de temperatura y humedad (Hogan M. C. 2018).

Ventilación y calidad del aire

Este factor es fundamental ya que además de aportar el oxígeno necesario, elimina la carga térmica producto de la respiración animal, la iluminación y los aparatos; diluye los gases y partículas contaminantes; ajusta el contenido de humedad del aire de la sala; y en donde sea necesario crea diferencia de presión de aire entre espacios adyacentes. Sin embargo, el establecer un índice de ventilación en el cuarto no asegura la adecuación de la ventilación en el encierro primario del animal y por lo tanto no garantiza la calidad del microambiente.

El grado de movimiento del aire o corriente de aire causa incomodidad y consecuencias biológicas. El volumen y las características físicas del aire suministrado a un cuarto y su patrón de difusión, influyen en la ventilación del microambiente del animal. El tipo y la localización de los difusores del suministro de aire, las ventanillas de salida del mismo, afecta la eficiencia de la ventilación del encierro primario (caja o jaula) y secundario (sala). Para evaluar estos factores, en relación con la carga de calor y los patrones de difusión del aire y lograr una óptima ventilación tanto del encierro primario como en la sala, son de gran utilidad los modelos de computadora.

Durante muchos años se ha usado la recomendación de 10 a 15 cambios por hora del volumen total de aire del encierro secundario y aún se considera un estándar general aceptable. Aun cuando es eficaz para muchas situaciones encontradas en los bioterios, esta recomendación no toma en cuenta el rango de las posibles cargas térmicas; las especies, tamaño y número de animales en cuestión; el tipo de lecho o la frecuencia de su cambio; las dimensiones del cuarto; o la eficiencia de la distribución del aire del encierro secundario hacia el primario. El uso de una recomendación tan amplia puede, en algunas situaciones, causar problemas al sobreventilar un encierro secundario que contenga muy pocos animales y por lo tanto desperdiciar energía, o bien subventilar otro encierro secundario en donde haya muchos animales y por lo tanto se acumulen los olores y el calor. Para determinar con mayor precisión la ventilación requerida se puede calcular, con la ayuda de un ingeniero mecánico, el índice de ventilación mínima (en metros cúbicos por minuto) necesario para acomodar las cargas de calor generadas por los animales. El calor generado por los animales se puede calcular con la fórmula de ganancia-promedio-del-calor-total publicada por la *American Society of Heating, Refrigeration and*

Air-Conditioning Engineers (ASHRAE, 1992). Esta fórmula es independiente de la especie y en consecuencia aplicable a cualquier animal que genere calor. La ventilación mínima requerida se obtiene calculando la cantidad de enfriamiento necesaria (carga de enfriamiento total) para controlar la carga de calor que se espera será generada por el número máximo de animales que pueden ser hospedados en el encierro problema, más cualquier otro calor generado de fuentes no animales y transferido a través de las superficies del cuarto. El método de cálculo de la carga total de enfriamiento también se puede usar en espacios para animales que tengan un índice de ventilación fijo y determinar el número máximo de animales (con base en la masa animal total) que pueden alojarse en ese espacio. Si bien este cálculo se puede usar para determinar la ventilación mínima necesaria para evitar la acumulación de calor, otros factores tales como: el control del olor, de alérgenos, la generación de partículas y el control de los gases producto del metabolismo, podrían demandar una ventilación mayor que el mínimo calculado (NRC 2011).

Se debe tener en cuenta que la calidad del aire en las habitaciones no solo tiene un impacto en la salud animal, sino que también es un componente importante para crear un entorno seguro para el personal que trabaja en las instalaciones para animales. Uno de los riesgos laborales más comunes para el personal que trabaja en los bioterios, es el desarrollo de alergias relacionadas con los animales o una mayor sensibilidad a los alérgenos. La calidad del aire de la habitación de los animales se ve afectada por la carga de partículas de una variedad de partículas, como la caspa de los animales y el polvo generado por la cama de los animales, por gases como los vapores de amoníaco y por agentes infecciosos tanto de animales como de seres humanos (Hogan M. C. 2018).

Iluminación

La iluminación adecuada es crucial para la fisiología y el comportamiento de un animal, y las alteraciones en el ciclo, la intensidad o el espectro de la luz pueden provocar estrés. Además de la duración, la intensidad y la longitud de onda, las especies y la cepa de los animales también son factores a considerar (NRC 2011) para el macroambiente.

La iluminación debe ser uniforme en todo el macroambiente para satisfacer los requisitos de iluminación específicos del animal y proporcionar suficiente luz para realizar los procedimientos de evaluación de la cría, la higiene y la salud animal. La iluminación debe estar en niveles apropiados independientemente de la ubicación del animal en la habitación. Para la mayoría de los bioterios la recomendación es de 325 lux aproximadamente a 1 m sobre el piso para las salas de animales, sin causar daño a la retina a los roedores albinos (NRC 2011).

Para controlar la intensidad de la luz y proporcionar la iluminación adecuada, la mayoría de las instalaciones modernas, están diseñadas para incluir sistemas de iluminación de dos niveles. Con este sistema, se puede establecer un nivel bajo de lux para los roedores albinos o en niveles más altos para animales con ojos normalmente pigmentados. La iluminación también se

puede ajustar de acuerdo con las necesidades del investigador o adaptarse a actividades de cría. Los bioterios más modernos utilizan sistemas computarizados para controlar la iluminación de dos niveles, los cuales pueden administrarse desde el escritorio o mediante acceso remoto a través de aplicaciones en dispositivos móviles (Hogan M. C. 2018).

Las instalaciones están diseñadas para proporcionar un entorno de luz controlada que evite que las influencias ambientales externas, como la iluminación natural, creando variaciones de los fotoperíodos programados. Los ciclos de luz deben garantizar que la salud animal no se vea comprometida y deben brindar ritmos diurnos y circadianos normales. Los ciclos de luz que proporcionan de 12 a 14 horas de luz al día son apropiados para la mayoría de los animales de laboratorio (Pritchett-Corning y col. 2011).

Dado que la mayor parte de la actividad humana en una instalación de investigación ocurre normalmente durante el día, el fotoperiodo más utilizado en las instalaciones de investigación animal es la iluminación durante el día y la oscuridad durante la noche. Durante este ciclo, las luces de la sala de los animales están encendidas durante el horario de trabajo normal del animalario y a un nivel de iluminación aceptable para permitir la cría de rutina, el cuidado veterinario y las actividades de investigación. Sin embargo, en algunas situaciones, los investigadores eligen ciclos de luz invertida, donde las luces están apagadas durante el día y encendidas durante la noche. Dado que los roedores son animales de hábitos nocturnos, este tipo de fotoperiodo es conveniente para que los investigadores observen las actividades y el comportamiento de estos animales. La iluminación de espectro rojo y los anteojos de visión nocturna pueden aliviar algunos de los desafíos permitiendo que el personal continúe con seguridad con sus actividades diarias. La iluminación del espectro rojo funciona debido a una diferencia en las células que forman la retina del ojo humano y del roedor (Pritchett-Corning y col. 2011). Los roedores no pueden percibir la luz roja, mientras que los humanos pueden ver esta longitud de onda de luz, lo cual permite continuar las operaciones diarias en el ambiente iluminado esta luz. Aunque la iluminación del espectro rojo es ampliamente reconocida por permitir un entorno de trabajo seguro para los seres humanos, un estudio reciente mostró evidencia de cambios marcados en los ritmos hormonales circadianos y corticosterona plasmática en ratas desnudas que estaban alojadas en jaulas teñidas de rojo. Como alternativa al uso de iluminación de espectro rojo, Faith y Huerkamp describieron los beneficios de las lámparas de sodio (vapor), que proporcionan niveles de luz suficientes para los humanos, pero atenúan la luz para los roedores a un nivel que permite el comportamiento nocturno (Faith y Huerkamp 2009).

Los sistemas de iluminación electrónicos más avanzados, son capaces de cambiar gradualmente la intensidad de lux, creando un efecto de anochecer a amanecer en lugar de un cambio brusco en la iluminación. Los cambios repentinos en la intensidad de la iluminación pueden provocar una respuesta de sobresalto en los animales. Por ejemplo, las aves que no están acostumbradas a fotoperíodos programados pueden volar y chocar con paredes u otros obstáculos cuando inesperadamente se apaga la luz. Algunas especies acuáticas requieren

iluminación de transición para estimular los comportamientos de alimentación, limpieza y comodidad (Hogan M. C. 2018).

Se sabe, que los ciclos de luz son muy importantes para mantener el ritmo circadiano natural, y que sus alteraciones pueden tener efectos perjudiciales en el cerebro, la función corporal y el comportamiento. Se observó que los ratones sometidos a un fotoperiodo de 20 horas (10 horas de luz y 10 horas de oscuridad) durante 6 a 8 semanas, mostraron cambios profundos en la cognición y la fisiología, aumento de la temperatura corporal, alteración de los niveles hormonales normales y aumento de peso. Otros estudios han demostrado que los cambios en el fotoperiodo produjeron alteraciones del comportamiento (aumento de la agresividad), así como cambios en la reproducción y una mayor susceptibilidad al cáncer y a enfermedades infecciosas. Dado que las interrupciones no programadas en los fotoperíodos pueden ser devastadoras para los resultados de la investigación, la iluminación debe controlarse electrónicamente y monitorearse regularmente para garantizar que los ciclos sean constantes (Hogan M. C. 2018).

Históricamente, se utilizan tubos de luz fluorescente, tipo luz de día, en el techo de los pasillos y en las salas de los animales. Lo más moderno es la introducción de diodos emisores de luz (LED), que, a niveles apropiados, demostraron que no interfieren con los ritmos circadianos ni causan efectos fototóxicos. Estas luces se colocan en las cuatro esquinas de las salas, para que todas las cajas reciban la misma cantidad de luz. Aunque la iluminación LED suele ser más cara al principio, consume menos energía y funciona durante más tiempo que las luminarias tradicionales. Otra opción, es el aumento de la iluminación natural a través de ventanas o tragaluces. Aunque no es recomendable, debido a la incapacidad de controlar estrictamente los fotoperíodos, puede ser parte de un programa de enriquecimiento ambiental para especies de nivel superior, como primates no humanos o animales de granja alojados en instalaciones de investigación (Hogan M. C. 2018).

Ruidos

Se ha demostrado que el ruido y la vibración afectan muchos parámetros de comportamiento y fisiológicos en animales y pueden ser una variable de confusión en estudios de investigación. Por lo tanto, deben evitarse, sobre todo los repentinos y estridentes. No utilizar sirenas ni alarmas. El aislamiento de los ruidos y las vibraciones debe considerarse desde el diseño de las instalaciones. El máximo nivel permitido es de 50 decibeles, si es mayor puede tener un efecto nocivo provocando estrés y problemas de fertilidad. Los roedores son muy sensibles a los ultrasonidos, pueden oír frecuencias mayores a 80 KHz. En general los sonidos constantes y de baja frecuencia son menos nocivos que los sonidos intermitentes y de alta frecuencia. Además de la intensidad, influye también la duración, el tiempo de exposición, la repetición, así como la especie y el estado fisiológico del animal expuesto. Los animales sometidos a determinados sonidos pueden presentar daños en los oídos, hipertensión, cambios en su peso corpo-

ral, en la respuesta inmune, en la química sanguínea, además de provocar canibalismo (Salvador Cabos N. 2001).

Es recomendable que las áreas donde se alojan los animales, estén bien separadas de las oficinas o sectores donde trabaja el personal, para reducir al mínimo las molestias a ambos ocupantes de las instalaciones. Los animales ruidosos, como los perros, cerdos, caprinos, y primates no-humanos deben alojarse lejos de los animales silenciosos como los roedores, conejos y gatos (ILAR 1999).

Olores

El olor es otro factor que afecta a los animales de experimentación, es por ello que no se debe utilizar desinfectantes que emanen olores, que sean irritantes y mucho menos desodorizantes, dentro de los ambientes del bioterio. Evitar todo tipo de perfume que enmascare los olores naturales de los animales, ya que pueden producir cambios en la conducta social.

La percepción de amoníaco en el ambiente es un indicador de saturación del lecho, por lo que se recomienda tener programas de cambio de lecho según la población que se maneje. Por ejemplo, se conoce que el hombre es capaz de percibir 100 ppm de amoníaco del ambiente del ratón y éste puede percibir desde 25 ppm.

Es fundamental también cuando nos referimos al macro y microambiente contar con un buen programa de enriquecimiento ambiental para asegurarnos el bienestar de los animales que se encuentran confinados y que serán utilizados en las distintas experiencias. Los elementos de enriquecimiento deben ser descartables o lavables y autoclavables, no tóxicos, no peligrosos ni estresantes *per se*.

Un buen manejo de todos estos factores nos permitirá mantener y producir animales de laboratorio definidos respetando los estándares internacionales.

Referencias

- Allen E.D., Czarra E.F., DeTolla L. Water Quality and Water Delivery Systems. Weichbrod RH, Thompson GAH, Norton JN, eds. *Management of Animal Care and Use Programs in Research, Education, and Testing. 2nd edition*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2018. Chapter 28. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500450/#> doi: 10.1201/9781315152189-28
- ASHRAE (American Society of Heating, Refrigeration, and Air Conditioning Engineers, Inc.) (1992) Chapter 25: Air cleaners for particulate contaminants. *ASHRAE Handbook, 1-P edition*. Atlanta: ASHRAE.

- Carter R.L. y Lipman N. S. (2018). Feed and Bedding. Weichbrod RH, Thompson GAH, Norton JN, eds. *Management of Animal Care and Use Programs in Research, Education, and Testing. 2nd edition*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis. Chapter 27. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500447/> doi: 10.1201/9781315152189-27
- CCAC (Canadian Council on Animal Care) (2003) *Guidelines on: laboratory animal facilities, characteristics, design and development*. p. 13.
- Davey A. K., Fawcett J. P., Lee S. E., Chan K. K., Schofield J.C., 2003. Decrease in hepatic drug-metabolizing enzyme activities after removal of rats from pine bedding. *Comp. Med.* 53 (3): 299-302.
- Faith, R.F. y Huerkamp M. J. (2009). Environmental considerations for research animals. *Planning and Designing Research Animal Facilities*. eds. Hessler J.R. y Lehner N. D. M. 59–83. San Diego: Elsevier.
- Hogan M.C., Norton J.N., Reynolds R. P. Environmental Factors: Macroenvironment versus Microenvironment. Weichbrod R. H., Thompson G. A. H., Norton J.N. Eds. *Management of Animal Care and Use Programs in Research, Education, and Testing. 2nd edition*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2018. Chapter 20. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500431/> doi: 10.1201/9781315152189-20
- Howdeshell, K. L., Peterman P. H., Judy B.M., Taylor J. A., Orazio C. E., Ruhlen R. L., Vom Saal F. S. y Welshons W. V. (2003). Bisphenol A is released from used polycarbonate animal cages into water at room temperature. *Environ. Health. Perspect.* 111(9): 1180-1187.
- ILAR (Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences) Medio ambiente, alojamiento y manejo de los animales. *Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio*. Edición Mexicana auspiciada por la Academia Nacional De Medicina. 1999. Copyright National Academy Press, Washington, D.C. 1996
- INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) (2010) *Guía para cuidado y uso de animales de experimentación*. p. 13-14.
- Jacobs, B. B. y Dieter D. K. (1978). Spontaneous hepatomas in mice inbred from Ha:ICR swiss stock: Effects of sex, cedar shavings in bedding, and immunization with fetal liver or hepatoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 61(6):1531-1534.
- NRC (National Research Council) (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington, DC: National Academy of Sciences.
- Nunamaker E.A., Otto K. J., Artwohl J.E. y Fortman J.D. (2013). Leaching of heavy metals from water bottle components into the drinking water of rodents. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 52 (1): 22–27.
- Ortman, J. A., J. Sahenk, and J. R. Mendell. 1983. The experimental production of Renault bodies. *J. Neurol. Sci.* 62: 233-241.
- Pritchett-Corning, K.R., Chou S. T, Conour L. A., y Elder B. J. (2011). Biology and reproductive biology. *Guidebook on Mouse and Rat Colony Management*. 14–44. Wilmington, MA: Charles River Laboratories.

Salvador Cabos N. (2001) Biología general del reactivo biológico. Jesús Zúñiga, Ramón Piñeiro González, Silvana Milocco y Josep Tur Marí (Eds.) *Libro Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal* (23-81). Madrid McGraw-Hill Interamericana.

Torronen, R., Pelkonen K., y Karenlampi S. (1989). Enzyme-inducing and cytotoxic effects of wood-based materials used as bedding for laboratory animals. Comparison by a cell culture study. *Life Sci.* 45:559-565.

CAPÍTULO 7

Calidad genética

Silvana Nora Milocco

Introducción a la genética de los animales de laboratorio

En las investigaciones donde se utilizan animales, la validez y la reproducibilidad de los resultados son factores claves y están determinados por tres variables fundamentales: los antecedentes genéticos, el ambiente físico y el estado sanitario de los animales de laboratorio. Dado que en los bioterios de producción el ambiente está controlado, se debe prestar especial atención a la calidad microbiológica y a la calidad genética de los mismos. Los científicos, médicos veterinarios, personal de cuidado animal y administradores de instalaciones deben conocer el patrimonio genético de los animales de investigación que desarrollan, usan, cuidan y albergan (Fahey y col. 2013).

Si nos remontamos al origen de los roedores de laboratorio y especialmente de los ratones y ratas, observamos que desde comienzos del siglo XX comenzaron a establecerse las primeras líneas estandarizadas. Los ratones se emplearon por primera vez para investigaciones genéticas por el biólogo francés Lucien Cuénot en 1902. La creación de la primera línea consanguínea fue la cepa DBA, llamada así por portar alelos mutantes recesivos en tres loci del color del pelaje: *dilute* (d), *brown* (b) y *non-agouti* (a). En el año 1918 en el *Cold Spring Harbor Laboratory* se desarrollaron las cepas más conocidas incluyendo C57BL/6, C57BL/10, C3H, CBA y BALB/c. Cabe señalar que muchas de las cepas endocriadas de ratones, ratas y cobayos que se utilizan en la actualidad, fueron producidas y desarrolladas entre 1920 y 1930. Posteriormente se distribuyeron en institutos de investigación y establecimientos comerciales de producción por muchas generaciones creando un gran número de líneas. Durante los últimos 30 años, las mejoras en las tecnologías que permiten la manipulación genética del genoma del ratón han permitido la creación de miles de cepas mutantes y animales modificados genéticamente, convirtiéndose en una excelente herramienta para el estudio de diversas enfermedades.

Existen más de 1500 cepas y stocks de ratas y ratones que se mantienen en laboratorios y bioterios de todo el mundo. Cada uno juega un rol único en las investigaciones biomédicas, y, por lo tanto, el conocimiento de sus cualidades, mantenimiento, control de calidad, nomenclatura y métodos de producción, son esenciales si se quieren utilizar de manera eficiente. Cada cepa o stock posee características genéticas únicas que deben tenerse en cuenta al seleccionar el modelo animal con el cual se va a realizar la experimentación. En algunos casos se requerirá de una población de animales uniformes, sin diferencias genéticas entre ellos, por lo

que se utilizarán cepas o líneas consanguíneas. En otros, el reactivo biológico deberá presentar alguna característica definida, y entonces las líneas coisogénicas, líneas congénicas o líneas genéticamente modificadas serán los modelos a escoger. En experiencias donde se quiera simular una población normal, se usarán líneas no consanguíneas o stocks exocriados, por ser animales con una amplia variabilidad genética. Y en aquellos casos en los cuales se busque que las diferencias genéticas tengan un rango de variación controlado y predecible se utilizarán los híbridos F1 y las líneas congénicas recombinantes (Jiménez Medina, 2001).

Características y mantenimiento de mamíferos de laboratorio genéticamente controlados

La variación genética, si no se controla, puede interferir con la precisión de una experiencia. Esta interferencia es similar a la que se produce cuando se trabaja con animales no definidos microbiológicamente o cuando se les administra una dieta variable o el macroambiente y el microambiente no están controlados. Pero si el método experimental utilizado es poco preciso y la meta del estudio es sólo obtener un resultado estimativo o si el efecto que produce dicho tratamiento es muy grande, entonces es posible utilizar animales genéticamente variables sin afectar la interpretación de los resultados. Sin embargo, si se pretende obtener resultados válidos, seguros, consistentes y reproducibles, deben utilizarse animales genéticamente definidos.

Colonias o stocks exocriados

Un stock exocriado es una colonia de animales de laboratorio no definidos genéticamente, generalmente mantenidos como una colonia cerrada. El término "no definido genéticamente" significa que el genotipo de un animal en un locus determinado, generalmente no se conoce. Excepto aquellos genotipos que pueden ser obvios como el color de capa, y tienen un alto grado de heterocigocidad.

Los stocks no son genéticamente estables a lo largo del tiempo, esto hace que su distribución nacional sea muy restringida, por lo que los resultados obtenidos en trabajos de investigación donde se los utiliza no serán comparables. Las colonias hermanas tendrán solamente una muestra de los genes presentes en la colonia parental (dependiendo del tamaño del grupo fundacional), así y todo, aún si las colonias tienen el mismo nombre y provienen del mismo stock, serán genéticamente distintas. Inclusive diferentes camadas serán genéticamente diferentes dependiendo del carácter estudiado y del grado de variabilidad intrínseca del stock. Sin embargo, todos los animales del mismo stock comparten características de grupo, como el color del pelaje, una buena tasa reproductiva, y en comparación con otras cepas son relativamente dóciles. Esto último, hace que las hembras se utilicen como nodrizas en técnicas de reproducción asistida (Benavides y col. 2020).

La ausencia de marcadores genéticos significa que la autenticidad de la colonia no se puede chequear con gran certeza. El control de calidad se basa comúnmente en la evaluación de los rasgos fenotípicos esperados, como el color del pelaje, el crecimiento y las características reproductivas, basándose en datos de las grandes colonias de criadores comerciales (Benavides y col. 2020). Si accidentalmente se mezclaran dos colonias pasaría mucho tiempo antes de que nos diéramos cuenta de lo ocurrido. Esta contaminación puede alterar los resultados de las experiencias.

Mantenimiento de un stock de exocría

Para mantener un stock se debe minimizar la velocidad de variación en un período determinado. Los cambios pueden ocurrir como resultado de la selección (la selección natural como respuesta a cambios ambientales o selección artificial impuesta por aquellas personas que manejan las colonias), endocría, deriva génica, mutaciones y contaminación genética. Siempre que sea posible se debe evitar la selección, excepto que los animales presenten anomalías o estén enfermos y deban ser sacrificados. La endocría y la deriva génica pueden controlarse manteniendo una población grande y siendo cuidadoso al elegir el sistema reproductivo. En una colonia cerrada, donde se realizan apareamientos al azar, la velocidad de endocría por cada generación es igual a:

$$F_1 = 1/8 N_m + 1/8 N_f$$

Donde F_1 es el aumento de la endocría en una generación dada y N_m y N_f es el número de machos y hembras que contribuyen potencialmente a la próxima generación.

Para mantener un porcentaje de endocría menor e igual al 1% se debe trabajar con 25 parejas de animales como mínimo. Lo ideal sería contar con 80 o más parejas reproductoras como fundadores del núcleo (Fig. 1).

Alojando animales con el mismo color de capa en distintas habitaciones se evita la contaminación genética. El monitoreo genético se puede utilizar para asegurar que no ocurra un cambio genético rápido. Sin embargo, el único método práctico para los stocks es el estudio de la forma de la mandíbula o bien encontrar un marcador genético que se segregue dentro de la población y determinar la frecuencia génica de dicho marcador en un número considerable de animales.

Nomenclatura

Si bien algunos stocks de exocría siguen teniendo una denominación histórica, tales como los ratones Swiss, las ratas Wistar o Sprague Dawley, los cobayos Dunkin-Harley y los conejos New Zealand White, esto no tiene significado alguno, ya que dos stocks pueden tener el mismo

nombre por estar remotamente relacionados y presentar características muy distintas, es decir, que sus nombres proporcionan poca información sobre sus características genéticas o fenotípicas (**Chia R. y col. 2005**).

El ICLAS (Consejo Internacional para la Ciencia de Animales de Laboratorio) recomienda que para que un stock se considere tal, tiene que haberse criado como una colonia cerrada durante por lo menos cuatro generaciones y debe tener menos del 1% de endocría por generación.

Debido a la falta de homogeneidad genética, estos grupos de animales deben nombrarse como "stocks" o "colonias" y no como cepas o líneas. Por la misma razón no existe una nomenclatura oficial sobre estos animales y los últimos reglamentos son de 1972 y no son aplicados con uniformidad. Actualmente, existen dos tendencias:

(i) utilizar nombres con 2 a 6 letras en mayúscula y aclarar en el texto que se trata de ratones exocriados (Por ejemplo: SENCAR, NMRI, etc.).

(ii) usar un nombre compuesto, colocando en primer lugar el código del criador o de la institución que produce los animales, dicho nombre debe escribirse abreviado, con mayúscula y no tener más de 4 letras; seguido van dos puntos que indican que se trata de un stock de exocría y por último el nombre del stock escrito con 2 a 4 letras mayúsculas. Por ejemplo: Cri:CD-1 (es el stock CD-1 criado en el "Charles River Laboratories"); N:NIH (S) (es un stock denominado NIH de origen Swiss (S) criado en el NIH (N)). (Davisson M. 1994).

Usos en investigación

El uso de estos animales va decreciendo con respecto a las cepas endocrías. Si bien no es una buena herramienta para llevar a cabo cierto tipo de investigaciones, en algunos casos tienen cierto valor como en estudios toxicológicos y farmacológicos, en los que es preferible emplear animales genéticamente no idénticos, pues así se simulan poblaciones normales. También son útiles cuando se necesita obtener una buena performance reproductiva y son muy utilizados en fisiología reproductiva, embriología y teratología. Al ser más económicos, pueden usarse cuando el costo del animal es muy significativo en proporción al costo total del experimento. También para poner a punto una nueva técnica, para la enseñanza, y cuando la uniformidad genética no es importante para los fines trazados. Finalmente, se utilizan en casos donde no hay cepas endocrías disponibles. Este es el caso de los grandes mamíferos utilizados en investigación como los conejos, perros, gatos, animales de granja, entre otros.

Stocks mutantes

Es un stock exocriado que tiene una mutación fija. La mutación puede encontrarse en estado homocigota dominante o recesivo o heterocigota. Existen más de 700 stocks mutantes de

ratones y 100 de ratas, de mucha importancia en investigaciones biomédicas. Hay varios modelos de obesidad y diabetes, desórdenes neurológicos, entre otros.

El mantenimiento de un stock mutante tiene sus ventajas y desventajas. La ventaja principal es su performance reproductiva. Las dos más grandes desventajas son la variabilidad en la expresión del carácter y la histoincompatibilidad entre el mutante y el individuo normal. Esto hace que no se utilicen en estudios inmunológicos, por ejemplo, para estudiar los efectos de trasplantes de tejidos normales a un mutante y viceversa.

Nomenclatura

Se denominan igual que el stock normal (sin mutación) agregándole el nombre del gen donde se encuentra la mutación: N:NIH (S)*Foxn1^{nu}*

Usos de stocks mutantes en investigación

En ratones (*ob/ob* ó *Lep^{ob}*), se llevan a cabo estudios importantes, como por ejemplo de infertilidad inducida por leptina, neuropatía diabética y fibrosis. Existen algunas mutaciones que causan alteraciones neurológicas, anemias y varios tipos de inmunodeficiencias. Los ratones N:NIH (S)*Foxn1^{nu}* son inmunodeficientes y se utilizan para mantenimiento de tumores pertenecientes a otras especies.

Cepas endocriadas

Una cepa endocriada se produce por el apareamiento ininterrumpido de hermanos por hermanas durante 20 o más generaciones, por lo tanto, todos los individuos tienen un antecesor común. De esta manera se logran animales genéticamente idénticos entre sí, que descienden de un único par de progenitores, los cuales no están emparentados. Estos cruzamientos endogámicos disminuyen la frecuencia de los genotipos heterocigotas y, al mismo tiempo se produce un aumento de homocigotas. La endocría se puede medir calculando el coeficiente de endogamia (F). El valor F nunca alcanza a 100, para que una cepa sea considerada como consanguínea debe tener por lo menos un F= 98,7%, el cual se alcanza en la generación número 20 de endocría. Se calcula que con cada generación de endocría el 19% de los loci que estaban en estado heterocigota pasan a ser homocigotas para uno u otro alelo, por eso se considera que después de la generación 20 de endocría la cantidad de loci que aún no se han fijado en el estado homocigota es menor al 1,3%. Sin embargo, se ha estimado que se necesitan 24 generaciones de apareamiento de hermanos para alcanzar una tasa de heterocigocidad menor al 1% y 36 generaciones para llegar casi al 100% de homocigocidad (Benavides y col. 2020).

Existen pocas cepas endocríadas de hámster, cobayo, conejo y otras especies debido a que es muy costoso, porque el aumento de la consanguinidad hace que comiencen a expresarse genes deletéreos disminuyendo la productividad y aumentando la susceptibilidad a enfermedades infecciosas y como consecuencia hay un aumento de la mortalidad.

Las cepas consanguíneas tienen las siguientes características:

Isogenicidad

Los individuos de una cepa endocríada son isogénicos, es decir son idénticos en más del 98,7% de los loci los cuales se segregaron en la colonia original de fundación. Esta es la propiedad más importante y como resultado de ésta, todos los individuos de la misma cepa serán histocompatibles, es decir, las cepas son singénicas. Los animales singénicos aceptan trasplantes de tejido de cualquier individuo de la misma cepa y sexo. Además, un solo individuo puede analizarse en un determinado locus y tendremos la certeza que cada uno de los individuos de esa cepa tendrán el mismo genotipo para ese locus. Por lo tanto, el perfil genético de los genes presentes en esa cepa podrá ser realizado por distintos investigadores o grupos de trabajo (Fig. 1).

Homocigocidad

Las cepas endocríadas son homocigotas en más del 98,7% de los loci los cuales fueron segregados de la población original. Pueden existir pocos genes recesivos escondidos, los cuales podrían llevar a confusiones, aún si se produjeran nuevas mutaciones pasaría un tiempo considerable antes que el gen se fijara. En contraste, los stocks exocríados pueden mantener genes deletéreos en una proporción cercana al equilibrio Hardy-Weimberg por muchas generaciones.

Estabilidad a largo plazo

Las cepas endocríadas se pueden mantener genéticamente constantes por largos períodos de tiempo. No se producen cambios como resultado de selección, endocría, o deriva génica. El único cambio que puede ocurrir es por medio de mutaciones y generalmente actúan mucho más lento que las otras fuerzas. Sin embargo, la deriva génica en cepas endocríadas como resultado de mutaciones ocurre y no debe ser ignorada. Afortunadamente es posible controlar este tipo de cambios genéticos manteniendo bancos de embriones congelados de cepas endocríadas.

Uniformidad fenotípica

La eliminación de la variación genética lleva a una gran uniformidad en la mayoría de las características dentro de la cepa endocríada. La importancia de esta uniformidad es que se necesitarán menos animales que si se utilizan un stock exocríado para alcanzar un nivel de precisión estadístico óptimo.

Individualidad

Cada cepa endocrizada es una combinación única de alelos estimada en 30.000 loci diferentes, y por lo tanto difiere entre cada cepa. Estas diferencias pueden ser de gran interés en investigaciones biomédicas. Un estudio del porqué una cepa desarrolla un tipo particular de tumor o un patrón particular de conducta, mientras otra cepa no se comporta de la misma manera, puede llevar a dilucidar el desarrollo de tumores o patrones de comportamiento respectivamente.

Identidad

Una vez que una cepa endocrizada se ha desarrollado y algunos loci polimórficos han sido caracterizados para proveer un perfil genético la cepa será identificada por su perfil genético.

Sensibilidad

Existen evidencias que las cepas endocrizadas son más sensibles a los cambios ambientales que un stock exocrizado. Su producción y uso requiere más atención en el manejo y en la dieta.

Distribución internacional

Algunas de las cepas más comunes tienen una distribución internacional, así trabajar en el Reino Unido, EEUU, Japón y Argentina puede ser virtualmente lo mismo trabajando con cepas endocrizadas de ratas y ratones. Esto es posible debido a la estabilidad a largo plazo que presentan estas cepas, el hecho de que colonias hermanas son iguales a la colonia original, y porque es mucho más sencillo realizar controles de calidad genética en estos animales.

Nomenclatura

Tomada del "*International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice*". Muriel T. Davisson, *Mouse Genome* 92, 1994 (Davisson M. 1994).

Símbolos

Las cepas consanguíneas deben designarse con letras mayúsculas o una combinación de letras mayúsculas y números (comenzando con letra), por ejemplo, la cepa de ratones DBA o la cepa de rata SHR, aunque existen algunas excepciones en cepas muy conocidas como la cepa 129. Los símbolos de nuevas cepas deben ser preferentemente cortos y previamente confrontados con la lista existente para evitar duplicaciones. Las cepas con un origen común, separadas antes de la generación 20 de endocría (F20), deben ser tomadas como cepas relacionadas y por lo tanto sugerirlo en el nombre, por ejemplo, las cepas de ratón NZB, NZC, NZO.

Símbolos abreviados

En algunos casos se permite utilizar abreviaturas para las cepas más conocidas. Por ejemplo, las cepas de ratón AKR (AK); BALB/c (C); C3H (C3); C57BL/6 (B6); C57BL/10 (B10); DBA/1 (D1); DBA/2 (D2).

Subcepas

Se debe utilizar el nombre de la cepa de origen, seguido de una barra y un símbolo apropiado de subcepa. Símbolos de subcepa: (a) números (ej.: DBA/1, DBA/2); (b) código del laboratorio, con la primera letra en mayúscula (ej.: BALB/cJ, la "J" es el código del Jackson Laboratory, USA); (c) iniciales de un apellido, con primera letra mayúscula (ej.: C3H/He, por Heston) y (d) la combinación de código y números. Algunas excepciones son permitidas en el caso de cepas muy conocidas como BALB/c, donde la "c" indica albinismo y no una subcepa.

Códigos de registro para laboratorios

Los códigos únicos de registro para cada laboratorio y los símbolos de subcepa son asignados por el ILAR (*"Institute for Laboratory Animal Resources"*) y deben solicitarse. El uso de estos códigos es apropiado para designar colonias de la misma cepa (sin diferencias genéticas) mantenidas por diferentes laboratorios. Debe colocarse al final del nombre completo de la cepa el signo "@" seguido del código del laboratorio, ej: C57BL/6J@Pas (la cepa C57BL/6 mantenida por el Instituto Pasteur).

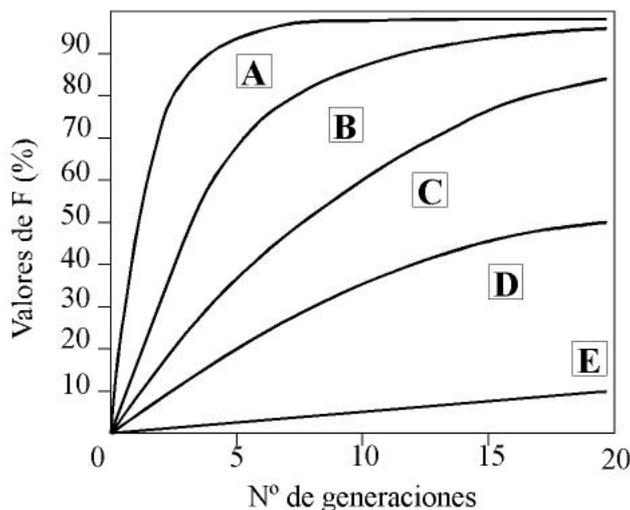


Figura 1. Efectos que los distintos sistemas de apareamiento tienen sobre el ritmo de aumento del coeficiente de consanguinidad (F). Mientras que el cruce al azar en poblaciones grandes garantiza un crecimiento muy lento de la consanguinidad (curva E), los cruces hermano por hermana (curva B) provocan incrementos rápidos del coeficiente de consanguinidad y, por tanto, de la homocigosis. Al cabo de 20 generaciones, éste alcanza valores cercanos al 99%. Curva A: autofecundación en organismos hermafroditas; Curva C: cruce entre primos hermanos; Curva D: cruce entre primos segundos. Adaptado de Festing MF. *Inbred strains in biomedical research*, Macmillan Press, London: Oxford University Press, New York, 1979.

Híbridos F1

Es la primera generación obtenida del cruzamiento entre dos cepas consanguíneas distintas. Si bien son genéticamente uniformes (isogénicas), serán heterocigotas para todos los loci en los que difieran las cepas parentales. La uniformidad genética a través del tiempo es una de las ventajas más claras de estas cepas de ratones. El vigor híbrido es otro de los rasgos destacados, presentan mayor resistencia a enfermedades y a cambios ambientales que las cepas que les dieron origen.

Nomenclatura

Se designan colocando primero a la progenitora, seguido por una "x" que simboliza el cruzamiento y en segundo lugar el macho, más F1. Puede utilizarse la forma completa del nombre: (C57BL/6 x DBA/2) F1 (por ejemplo, si es la primera vez que se lo menciona en una publicación) o su forma abreviada B6D2F1.

Cepas endocríadas recombinantes

Estas cepas son producidas a partir de dos cepas endocríadas progenitoras que se aparean para obtener híbridos F1. Estos se vuelven a cruzar y así obtenemos híbridos F2. De estos últimos se seleccionan al azar machos y hembras que se endocrían nuevamente dando origen a múltiples líneas. El reordenamiento y fijación de los genes originalmente presentes en las cepas progenitoras ocurre al azar en las cepas recombinantes así obtenidas.

Nomenclatura

Se designan con los símbolos abreviados de las cepas parentales separados por la letra "X" en mayúscula y sin dejar espacios. Se coloca el símbolo de la hembra primero. Por ejemplo: BXC es una línea recombinante derivada de una hembra C57BL/6 y un macho BALB/c.

Cepas coisogénicas

Si ocurre una mutación en una cepa endocríada se puede desarrollar una sublínea mutante. Si estos animales son totalmente viables y se propagan apareando a los homocigotas mutantes, entonces la línea mutante diferirá de la cepa endocríada solamente en un locus, denomi-

nado locus mutante. Dos cepas endocriadas que son genéticamente idénticas excepto en un solo locus como resultado de una mutación dentro de la cepa y una subsecuente separación en sublíneas, se dice que son coisogénicas. Actualmente se puede pensar en producir cepas coisogénicas para cualquiera de los genes clonados existentes, mediante la tecnología de “*gene targeting*”, el cual es el proceso de alterar una secuencia o gen específico en su ubicación en un genoma. Las posibles modificaciones incluyen la delección, inserción o sustitución de la secuencia endógena con secuencias alternativas. El direccionamiento se puede lograr mediante recombinación homóloga en algunos organismos o con nucleasas de edición del genoma dirigidas al sitio.

Nomenclatura

Las líneas coisogénicas deben designarse por el símbolo de la línea seguido de un guion, luego se escribe el símbolo del gen o alelo diferencial, por ejemplo: C57BL/6JEi-*tth* mutación *tth* (*tumor tilted head*) en la línea C57BL/6JEi

Cepas congénicas

Las cepas congénicas son aquellas producidas por retrocruzamientos. Es decir, cruzamientos repetidos de animales portadores de un gen mutante con animales de una cepa endocriada que normalmente no es portadora de dicho gen. Se obtienen retrocruzando durante 10 a 12 generaciones el híbrido F1 portador de la mutación seleccionada, con la cepa a quien quiere insertársele la mutación o cepa receptora. La línea así obtenida se mantiene luego en estado homocigótico por cruzamiento entre hermanos. Con este sistema no sólo se transfiere el gen mutante sino también una porción cromosómica adyacente, cuyo tamaño dependerá del número de generaciones de retrocruzamientos usados para obtener la cepa congénica.

Nomenclatura

Las líneas congénicas se designan 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 guion 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.

Cepas consómicas

En estas cepas se producen introduciendo un cromosoma entero a una línea receptora por medio de retrocruzas. Se denominan también líneas con sustitución de cromosoma Al igual que las líneas congénicas, se necesitan por lo menos diez generaciones de retrocruzas para obtenerlas. Generalmente se utiliza el cromosoma Y como donante, por ejemplo, para obtener animales con fondo C57BL6 pero que porten un cromosoma Y en su totalidad *Mus musculus castaneus* (la nomenclatura sería B6-Y^{CAS}). Para introducir cromosomas autosómicos las cruzas deben asistirse por marcadores moleculares, generalmente microsatélites (Benavides y col. 2004).

Animales genéticamente modificados

Animales transgénicos

La transgénesis consiste en la introducción de un gen extraño en el genoma de un individuo mediante la manipulación directa del cigoto del que procede. La producción de animales transgénicos, principalmente ratones, ha significado un gran avance científico para el estudio de los efectos de la expresión del gen introducido, ya sea normal o mutado. También para la obtención de modelos animales de enfermedades genéticas humanas o animales (Benavides y col. 2004).

Los métodos para obtener ratones transgénicos son: transgénesis por microinyección en el pronúcleo, transgénesis mediada por vectores y la transformación de células embrionarias (ES) in vitro con el ADN de interés.

Transgénesis por microinyección en el pronúcleo

Los ratones fueron los primeros animales transgénicos, hecho que ocurrió en el año 1980. Dos años más tarde, los científicos lograron introducir el gen de la hormona de crecimiento de la rata en ratones. Como resultado, los ratones crecieron mucho más rápido que los controles. Con esta y otras experiencias se demostraba que un gen de otra especie podía introducirse en un ratón, integrarse a su genoma, ser funcional y transmitirse a la descendencia.

La mayoría de los animales transgénicos se obtiene por medio de la microinyección de fragmentos de ADN extraño, directamente en uno de los dos pronúcleos de embriones en fase de una célula. A partir de ese momento, es posible que se produzca la incorporación del transgén en algún cromosoma del embrión. Es improbable predecir el lugar o el número de copias que se van a incorporar, es decir que el transgén microinyectado se integra aleatoriamente en el genoma como una copia única o más a menudo como un concatémero (cadena de ADN que contiene múltiples copias de una secuencia de nucleótidos dispuestas en serie una tras otra). Por este motivo, es probable que la expresión del transgén sea diferente y que se obtengan

fenotipos diferentes, a pesar de haber incorporado una misma porción de ADN (Benavides y col. 2020). Normalmente el ADN se integra en el genoma del 5-30% de los cigotos inyectados.

Transgénesis mediada por vectores

Los vectores virales son los más eficaces para transferir genes, ya que pueden transformar específicamente a una célula, y así promover la expresión de genes. Dentro de estos virus se encuentran los virus recombinantes, los adenovirus, los virus adeno- asociados, los retrovirus y los virus herpes simplex. La elección del vector va a depender de la eficiencia de la expresión del transgén, es importante que su realización sea sencilla y segura (Legorreta-Herrera M. y col. 2012). Los virus se integran en el genoma de las células infectadas, produciéndose la inserción de una sola copia del vector en un cromosoma dado. En este caso sólo se observan algunos cambios en el sitio de integración. La mayor desventaja de este método es que la expresión del ADN introducido se presenta en niveles bajos, otra desventaja es que dicha porción debe ser de tamaño pequeño (alrededor de 10 kb).

Una variante es el uso de vectores lentivirales para la producción de ratas y ratones transgénicos. Si bien los lentivirus también pertenecen a la familia de los retrovirus, la ventaja es que tienen la capacidad de infectar células en división y células en reposo, lo cual es muy ventajoso (Benavides y col. 2004).

Mutagénesis dirigida por recombinación homóloga de células madre embrionaria (*gene targeting*). Ratones knockout. Ratones knockin.

Esta técnica se basa en la atracción que tienen las regiones homólogas en la secuencia del ADN, permitiendo el intercambio de material genético entre dichas regiones. Es decir, que el transgén a insertar (exógeno) es homólogo a una región del ADN cromosómico (endógeno), y por lo tanto se localizará en un área específica del cromosoma. De esta manera, se puede predecir el sitio en donde se insertará el gen exógeno, y así se evita el inconveniente de la inserción al azar, como sucede en la inyección de pronúcleos. Es importante destacar que, en el proceso de recombinación homóloga, el ADN es intercambiado, a diferencia del proceso de inyección de pronúcleos, en donde el ADN resulta añadido. Este proceso no puede emplearse directamente en embriones, por lo que debe realizarse en células madre embrionarias. Estas células se obtienen del blastocisto y tienen la capacidad de permanecer en cultivos celulares sin perder su estado indiferenciado. Una vez seleccionadas las células que incorporaron el gen de interés correctamente, se las introduce en un embrión huésped.

Este método es el más utilizado para la generación de **ratones knockout y knockin**. En el caso de los ratones knockout se inactivan genes específicos mediante la inserción de un transgén que lleva información para la eliminación de uno o varios exones del gen que se desea anular. De esta forma, se impide la producción de la proteína de interés o se obtiene una proteína no funcional. Con esta técnica se han obtenido cientos de ratones knockout que han servido para analizar la función de genes endógenos y que han permitido simular enfermedades humanas para su estudio (Cavagnari BM., 2010) (Herrera Torres AM, 2005). Los knockin son

ratones en los que se introducen mutaciones dirigidas en la secuencia de un determinado gen; por ejemplo, la modificación de un codón concreto en la secuencia codificante para generar un cambio de aminoácido en la proteína correspondiente o la sustitución de la secuencia codificante de un gen, o de uno de sus dominios, por la de otro (De Jesús R. y col 2006).

Animales modificados genéticamente mediante edición génica. Sistema CRISPR/Cas9

La edición génica mediada por el sistema CRISPR/Cas9 es una tecnología de ingeniería genética que permite modificar el genoma de organismos vivos suprimiendo, alterando o agregando genes con el fin de introducir mutaciones específicas o corregirlas. A diferencia de otras herramientas usadas para alterar la secuencia de ADN, esta tecnología, bautizada como tijera molecular, permite eliminar o modificar la información genética de manera precisa y controlada de forma relativamente sencilla y cada vez más segura. La edición genética nos permite modificar, a voluntad, cualquier posición de cualquier gen de cualquier organismo. No se añade ningún gen externo, por lo tanto, no se trata de organismos transgénicos. Tan solo se modifica alguna letra del gen de interés, bien sea para inactivarlo o para reactivarlo. Las siglas CRISPR/Cas9 provienen de *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, en español “Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente interespaciadas.” La segunda es el nombre de una serie de proteínas, principalmente unas nucleasas, que las llamaron así por “*CRISPR associated system*” (es decir: “sistema asociado a CRISPR”).

Con el desarrollo esta técnica, se ha vuelto relativamente sencillo modificar genéticamente ratones y estudiar modelos mutantes. Los investigadores han utilizado modelos de desactivación de CRISPR para revertir la ceguera en ratones. Otro equipo ha utilizado modelos de ratón de CRISPR de retinosis pigmentaria para probar si es posible revertir la ceguera.

Además de los estudios mencionados anteriormente, CRISPR-Cas9 se ha utilizado para editar el gen de la β -globina para aumentar los niveles de hemoglobina fetal y así corregir con éxito la anemia de células falciformes en ratones. En otros estudios se ha utilizado CRISPR para alterar un gen que produce el aumento de los niveles de proteína amiloide- β en la enfermedad de Alzheimer. CRISPR también ha mostrado resultados prometedores en la edición del alelo genético responsable de la enfermedad de Huntington.

La contaminación genética y los controles de calidad

Los controles genéticos en los animales que se utilizan en investigación son de suma importancia, ya que cualquier cambio no detectado involucra una alteración de sus características fenotípicas. Tales alteraciones genéticas pueden producirse por mutaciones espontáneas, y frecuentemente pasan inadvertidas. Además, pueden acumularse en el tiempo, haciendo que la cepa se desvíe gradualmente de su estándar genético inicial, hasta alcanzar diferencias inadmisibles. Otra causa de contaminación genética se produce por un mal manejo de las colonias de animales, debido a errores en la selección de los progenitores. Estas alteraciones son

fácilmente evitables con un programa de cruces apropiado, pero cuando ocurren, sus efectos son drásticos e irreversibles (**Jiménez Medina, 2001**). De aquí la necesidad de establecer controles genéticos en las colonias de animales utilizados en investigación, para que los resultados sean reproducibles y tengan validez científica (**De Jesús R. y col 2006**). Frecuentemente, la obtención de resultados erróneos en una investigación es atribuida a distintos factores experimentales, pero muy pocas veces se repara en verificar la pureza genética de los animales utilizados (**Benavides y col. 2004**).

A través de un conjunto de técnicas se puede comprobar si los animales que se utilizan guardan las características genéticas originales de la línea a la cual pertenecen, o si presentan algún cambio a causa de una contaminación genética. Debemos tener en cuenta que estos controles no detectan mutaciones espontáneas, ya que al producirse al azar habría que evaluar todo el genoma.

Los controles para determinar la pureza genética se basan en el análisis de caracteres cualitativos o cuantitativos (enzimas, marcadores inmunológicos, marcadores de ADN) y compararlos con valores de referencia establecidos internacionalmente para la cepa. En todos los casos se trata de utilizar marcadores lo suficientemente polimórficos entre líneas como para detectar cruza accidentales (Benavides y col. 2004).

Se deben realizar controles de rutina, en bioterios donde se alojan cepas del mismo color de capa en la misma sala y cuando se sospecha de una contaminación genética.

Con motivos didácticos, podemos agrupar las técnicas de control genético en aquellas que controlan loci individuales y las que lo hacen sobre varios loci simultáneamente. Dentro del primer grupo encontramos los marcadores bioquímicos, los marcadores inmunológicos, el análisis del color del pelaje, caracteres reproductivos y la tipificación de microsatélites de ADN. Dentro de las técnicas que controlan varios loci simultáneamente encontramos los injertos de piel, los estudios morfológicos, el comportamiento reproductivo y el fingerprinting de ADN. En resumen, cualquier metodología que nos permita discriminar entre líneas consanguíneas puede ser empleada para un control genético. Aquellos laboratorios que realizan técnicas de PCR en forma rutinaria podrán incorporar otras variantes del control genético, más allá del análisis de marcadores microsatélites. Entre esas posibilidades se encuentran las técnicas RAPD's (*random amplified polymorphic DNA*), *LINE repeat sequence-PCR*, Inter-SSR PCR, análisis de SNP's, entre otras.

El control de los stocks se realiza a través de mediciones en el hueso de la mandíbula, ya que se demostró que su tamaño y forma están determinados por un grupo numeroso de genes de herencia cuantitativa. Para realizar este control se disecan y limpian las mandíbulas de un grupo de individuos. Su forma y tamaño se determina midiendo las distancias desde once puntos de referencia predeterminados hasta unos ejes de coordenadas rectangulares. Los datos así obtenidos se procesan posteriormente mediante un programa informático, que determina si tales parámetros se apartan o no del patrón que define al stock en cuestión.

Referencias

- Fahey JR., Kato H, Malcolm R. y Perez A. (2013) The case for genetic monitoring of mice and rats used in biomedical research. *Mamm Genome*. 24 (3-4) 89–94.
- Jiménez Medina R. (2001) Estandarización genética, transgenización y clonación. Jesús Zúñiga, Ramón Piñeiro González, Silvana Milocco y Josep Tur Marí (Eds.) *Libro Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal* (179-202). Madrid McGraw-Hill Interamericana.
- Benavides F., Rüllicke T., Prins JB., Bussell J., Scavizzi F., Cinelli P., Herault Y. y Wedekind D. (2020). Genetic quality assurance and genetic monitoring of laboratory mice and rats: FELASA Working Group Report. *Laboratory Animals*. 54 (2) 135-148
- Chia R., Achilli F., Festing M y Fisher E. (2005) The origins and uses of mouse outbred stocks. *Nature Genetics*. 37 (11) 1181-1186.
- Davisson M., (1994) International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice". *Mouse Genome* 92.
- Benavides FJ. y Guénet JL. Las líneas genéticamente estandarizadas y los controles de la pureza genética. *Libro Manual de genética de roedores de laboratorio: Principios básicos y aplicaciones* (105-136) Universidad de Alcalá de Henares. Servicio de Publicaciones.
- Legorreta-Herrera M., Martínez-Flores F., Hernández Sánchez F. y Zentella-Dehesa A. (2012) Los vectores virales y la transgénesis. *Vertientes. Revista Especializada en Ciencias de la Salud, UNAM*. 15 (1) 5-14.
- Benavides FJ. y Guénet JL. La transgénesis y la clonación en los roedores de laboratorio *Libro Manual de genética de roedores de laboratorio: Principios básicos y aplicaciones* (208-263) Universidad de Alcalá de Henares. Servicio de Publicaciones.
- Cavagnari BM. (2010). Generación de animales transgénicos. Regulación de la expresión genética. *Arch. Argent. Pediatr*. 108 (5) 438-444.
- Herrera Torres AM. (2005). Principios básicos y simples de la tecnología transgénica y knockout. *Rev. CES. Med*. 19 (1) 43-51.
- De Jesús R. y Torres E. (2006) Evaluación de factores de reproducción para detectar posible contaminación genética en cepas consanguíneas de ratones. *Bol. Mal. Salud Amb*. Vol 46 (2) 161-168.

CAPÍTULO 8

Calidad sanitaria de ratas y ratones de experimentación

Cecilia Carbone y Miguel A. Ayala

El animal de experimentación es un instrumento de medida, que como tal debe estar calibrado para que cuando se utilice se logren resultados o mediciones precisas y confiables. A nadie se le ocurriría pesar una sustancia en una balanza que no esté calibrada y tampoco recurriría a la sal de cocina en caso de necesitar una solución de ClNa químicamente pura. Por esta razón la estandarización de los animales de laboratorio es tan importante a la hora de utilizarlos con fines científicos. Esta exigencia sobre la calidad de los animales está íntimamente relacionada con las recomendaciones y estándares internacionales, con el principio de las 3 Rs y fundamentalmente con el bienestar animal.

Los animales de laboratorio son individuos complejos en los que hay que tener en cuenta factores intrínsecos, propios de cada animal, como su condición genética, edad, sexo y ritmo biológico; factores ambientales que influyen en ellos fuertemente, como el lugar de alojamiento, el alimento, agua de bebida, temperatura, lecho y demás componentes del micro y macroambiente. A esto se suma el trato y manejo que ejercen las personas sobre el animal, el grado de severidad de los procedimientos experimentales, la sintiencia, que es la capacidad que tienen los animales de experimentar emociones tanto positivas como negativas, el tiempo que duran los procedimientos, el estrés, dolor, sufrimiento, transporte y el estrés social (Guillen 2012).

Es de notar que las personas no tienen intervención en los factores propios, intrínsecos de los animales, esto indica que la estandarización y calidad de los animales de experimentación dependen de sus propias características y del tipo de manejo, cuidado y uso que se les brinde.

Entre los factores ambientales se encuentran las infecciones, estas se deben a la presencia de microorganismos y son inadmisibles en un animal que se considere que tiene buena calidad sanitaria.

¿Por qué es importante garantizar la calidad sanitaria y microbiológica de los animales de experimentación? En primer lugar, porque los animales pueden estar infectados con microorganismos zoonóticos y esto representa un riesgo importante para las personas y el ambiente. En segundo lugar, debido a que existen evidencias científicas de que todos los microorganismos patógenos y oportunistas producen alteraciones en los animales por lo cual si están infectados dejan de reunir la condición de estar estandarizados o definidos sanitariamente.

Es decir que la condición sanitaria de los animales de experimentación puede influir decisivamente en el bienestar animal y en la validez y confiabilidad de los resultados de las investigaciones. Por lo tanto, es importante que tanto las instalaciones para cría como las experimentales establezcan un programa de vigilancia de la salud animal en los laboratorios (HM, del inglés Health Monitoring) como parte de un sistema de garantía de calidad (Nicklas y col. 2010). Se debe considerar que todos los microorganismos, parásitos, bacterias, virus y hongos, que están presentes contaminando a los animales actúan indefectiblemente como variables experimentales. Esto significa que es fundamental establecer y conocer la categoría microbiológica de los modelos animales ya que se debe tener presente que los microorganismos representan un riesgo para las personas, los animales y para la investigación o ensayo que se esté realizando.

Ahora bien, ¿Cómo surgió la necesidad de estandarizar sanitariamente a los animales de laboratorio? Sucedió que luego de 1945, durante la posguerra, se realizaron experiencias sobre la influencia de la radioactividad utilizando ratones y estos morían muy fácilmente. Esto llevó a las personas involucradas en la investigación a indagar y descubrir que los animales estaban infectados con macroorganismos que interferían en el desarrollo del estudio.

De esta forma se comenzó a considerar de gran importancia la estandarización de los factores ambientales que rodean a los animales, su micro y macroambiente. Asimismo, las instalaciones y aspectos edilicios y el manejo que se realiza dentro del bioterio (Guillén 2012).

Existen una serie de factores que son los que van a hacer posible mantener animales de determinada condición sanitaria en un bioterio:

Infraestructura y equipamiento

Se refiere a la estructura y condiciones que reúne el edificio que aloja a los animales, en el mismo es importante considerar el diseño el cual haga posible establecer una zona limpia, restringida y aislada del exterior circundante, y una zona sucia, además de un sistema de circulación del personal, insumos y animales y que permita la instalación y funcionamiento de barreras sanitarias.

Las barreras sanitarias son un sistema que combina aspectos constructivos, equipos y procedimientos de trabajo que estabilizan las condiciones ambientales de las zonas restringidas reduciendo al mínimo la probabilidad de que organismos patógenos u otros indeseables se pongan en contacto con los animales alojados en dichas zonas.

De manera que absolutamente todos los elementos que vayan a entrar en contacto con los animales deberán ser tratados previo a su ingreso a la zona limpia. Esto incluye fundamentalmente el aire que debe ser filtrado y 100% exterior. También el personal que debe ingresar con indumentaria estéril y estar debidamente entrenado.

Si el bioterio cuenta con infraestructura, equipamiento adecuado, incluyendo el sistema de alojamiento de los animales y con personal debidamente capacitado será posible producir o mantener animales de buena calidad sanitaria.

Por lo tanto, de acuerdo con la presencia o ausencia de microorganismos los ratones y las ratas de laboratorio se clasifican en:

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. Deben estar libres de toda evidencia de enfermedades infecciosas transmisibles al hombre, tanto en el examen clínico como en el post mórtem. Se refiere a las siguientes entidades biológicas consideradas zoonóticas: *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Streptobacillus moniliformes*, *Virus de la coriomeningitis linfocitaria*, *Virus Hanta*, *Leptospira spp.*, dermatofitos y *Sarcoptes scabiei*

En los animales que pertenecen a esta categoría sanitaria se recomienda realizar un control sanitario cada seis meses.

Libres de patógenos específicos (SPF, del inglés Specific Pathogen Free)

Son animales que poseen su microbiota intestinal normal pero que están libres de un listado de microorganismos infecciosos específicos de la especie. Se obtienen a través de técnicas de histerectomía, la cual se basa en la capacidad que tiene la placenta de filtrar la mayoría de los microorganismos o por transferencia embrionaria. Se debe aclarar que estos procedimientos se realizan solamente para la obtención de los progenitores, ya que, a partir de estos, una vez confirmada su condición sanitaria de SPF, se llevan a cabo programas de apareamiento tradicionales. De esta forma, cuando los científicos usuarios necesitan estos animales, los adquieren en centros de referencia.

Los animales SPF se crían y mantienen en bioterios bajo un sistema combinado de barreras sanitarias absolutas y relativas. El personal técnico que cuida y mantiene a estos animales debe estar debidamente entrenado. Con respecto a la lista de microorganismos que deben estar ausentes, esta ha sido consensuada a nivel internacional, tomando como criterio en primer lugar a aquellos microorganismos potencialmente zoonóticos, seguidos por los de alta prevalencia, capaces de diezmar colonias de ratas y ratones y por último los de baja prevalencia y microorganismos oportunistas que serán indicadores del estado de higiene de la colonia. Una de las listas de referencia a nivel internacional y que se acepta en Argentina es la sugerida por FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations). Para confirmar su condición sanitaria se recomienda realizar tres a cuatro controles sanitarios anuales.

Libres de patógenos específicos y oportunistas: (SOPF, del inglés Specific and Opportunistic Pathogen Free)

En casos en los cuales los animales de experimentación tengan algún compromiso o deficiencia en su sistema inmunitario, también deberán estar ausentes los patógenos oportunistas. La inmunodeficiencia puede deberse a la condición genética de los animales (animales genéticamente modificados) o suscitarse debido a la experiencia a la cual sean sometidos. La mayoría de estos agentes están presentes en el ambiente o son transmitidos por las personas que entran en contacto con los animales. Estos agentes no son patógenos para roedores inmunocompetentes. Sin embargo, en modelos inmunodeficientes o con algún tipo de sensibilidad pueden causar infecciones localizadas o sistémicas.

Tanto los animales SPF como los SOPF se pueden alojar en racks ventilados o también en cajas de ventilación individual (del inglés: individual ventilated cages, IVC) y también en aisladores flexibles o semi flexibles. Sin embargo, los aisladores son costosos y su control y mantenimiento complicado por lo cual en general se usan las dos primeras opciones.

Libres de gérmenes (GF, del inglés Germ Free) o axénicos

Son aquellos animales en los cuales no se detecta ningún microorganismo mediante los métodos hasta ahora conocidos. Carecen de todos los microorganismos, es decir que son individuos microbiológicamente estériles, que tampoco tienen su microbiota normal. Se alojan en aisladores flexibles o semi flexibles estrictamente controlados de manera de evitar contaminaciones, la sala donde se instalan los aisladores debe disponer de barreras sanitarias estrictas. Su control sanitario se recomienda hacerlo cada 15 días

Gnotobióticos del griego, *gnoto* (conocimiento) *bio* (vida)

Son animales axénicos a los que se los ha infectado con uno o más microorganismos, de manera que se transforman en monobióticos, dibióticos o polibióticos de acuerdo con el número de microorganismos presentes (Darnaud y col 2019). Es decir, se trata de un animal cuyo microbiota es totalmente conocida y controlada. Técnicamente, el término también incluye a los animales libres de gérmenes, ya que igualmente se conoce su estado de ausencia de microorganismos.

Al igual que los axénicos, estos animales deben alojarse en aisladores, en ambientes totalmente estériles y ser cuidados y manejados por personal con competencias acorde con los requerimientos de esta condición.

Los animales SPF, SOPF y axénicos se obtienen a través de la técnica de histerectomía la cual se basa en la capacidad que tiene la placenta de filtrar la mayoría de los microorganismos. Se parte de una hembra donadora preñada a término a la que se le realiza la eutanasia mediante dislocación cervical, para inmediatamente extraer el útero grávido y en ambiente totalmente estéril obtener las crías que, una vez que se comprueba que son viables, se las entrega a una nodriza de condición SPF.

Otra técnica, que es actualmente la más utilizada, es la transferencia embrionaria. Para ello se induce la superovulación de las hembras, se obtienen embriones mediante fertilización in vitro que van a transferirse a hembras pseudopreñadas SPF o GF que gestarán y parirán las

crías en aisladores o cajas IVC. Una vez que se cuenta con un núcleo de animales SPF o GF se aparean normalmente.

En los últimos años ha cobrado mucha relevancia la microbiota de los animales de experimentación que es la población microbiana presente en los diferentes ecosistemas del cuerpo, es decir, es el conjunto de microorganismos (predominantemente bacterias, también virus, hongos y protistas), que residen en el cuerpo de los animales (J.O'Rourke 1998). A veces se confunde con el término microbioma, que es mucho más amplio y hace referencia al conjunto de esas comunidades microbianas incluyendo sus genes y metabolitos, así como las condiciones ambientales que les rodean. Estos ecosistemas microbianos se encuentran en el tracto gastrointestinal, genitourinario y respiratorio, la cavidad oral y nasofaríngea, y la piel.

En el caso de los animales que se utilizan con fines científicos el microbiota intestinal es muy importante ya que cada vez, existe más evidencia de que esta juega un papel importante en la modulación de la respuesta inflamatoria y en las enfermedades como el desarrollo de tumores, siendo el equilibrio entre cepas patógenas, oportunistas y aquellas beneficiosas para el organismo.

Se han realizado estudios que han demostrado que el microbiota intestinal puede cambiar el comportamiento de los roedores enviando al cerebro las señales responsables de regular la insulina. Es decir que influye en los cuadros de obesidad y diabetes.

Algunos de estos microorganismos pueden producir metabolitos específicos, denominados neurotransmisores. Y la presencia o ausencia de estos neurotransmisores podría afectar indirectamente al cerebro y, por ende, influir en el nivel de ansiedad y en el comportamiento.

Los ratones libres de gérmenes (Germ Free) son una herramienta esencial para estudiar la relación que existe entre el microbioma y las enfermedades y para determinar las bases del mecanismo a través del cual los microorganismos influyen en el huésped (Grover y col.2014).

Estos animales también son clave para dilucidar el rol del microbioma en las enfermedades. Por ejemplo, los investigadores comprobaron que las comunidades bacterianas del microbiota intestinal pueden proteger de la obesidad o de las alergias alimentarias, mientras que otros microorganismos pueden provocar inflamación crónica, afecciones autoinmunes, hígado graso y artritis.

Los ratones Libres de Gérmenes se pueden asociar a uno, dos o más microorganismos transformándose en gnotobiotas permitiendo investigar el efecto que estos causan en el organismo.

En síntesis, el uso de los animales libres de gérmenes (GF) o axénicos incluye:

- La identificación de las causas de las enfermedades mediante la comparación de animales GF con convencionales.
- Determinar cómo microbiomas específicos protegen o contribuyen con las enfermedades
- El estudio y descubrimiento de estrategias farmacológicas
- El desarrollo de investigaciones sobre los mecanismos de regulación de los microorganismos en el huésped
- Investigaciones sobre terapéutica y tratamientos en oncología, inmunología, neurociencia y enfermedades infecciosas.

Por lo tanto, es inaceptable utilizar animales infectados en investigaciones, pruebas, ensayos y en docencia, ya que se producen alteraciones fisiológicas y morfológicas. Se generan cambios en el comportamiento de los animales, en la curva de crecimiento, el peso de los órganos, en la reproducción y especialmente en la respuesta inmune. Además de que se alteran los resultados, no se cumple con los estándares de bienestar animal y con las pautas éticas y morales por estar utilizando seres vivos.

Referencias

- Guillén, Javier (2012) FELASA Guidelines and Recommendations. J Am Assoc Lab Anim Sci. May; 51(3): 311–321. Published online 2012 May.
- J. O'Rourke, A. Lee & J. McNeili. (1988) Differences in the gastrointestinal microbiota of specific pathogen free mice: an often-unknown variable in biomedical research *Laboratory Animals* 22, 297-303
- Marion Darnaud, Filipe De Vadder, Pascaline Bogeat, Lilia Boucinha, Anne-Laure Bulteau, AndreiB- unescu, Julie Chaix, Céline Couturier, Ana Delgado, Hélène Dugua, Céline Elie, Alban Mathieu, Djomangan (2019). A standardized gnotobiotic mouse model harboring a minimal 15-member mouse gut microbiota recapitulates SOPF phenotype doi: <https://doi.org/10.1101/12.30.890954>
- M Grover P C Kashyap. (2014) Germ-free mice as a model to study effect of gut microbiota on host physiology. *Neurogastroenterology* Jun; 26(6):745-8 doi: 10.1111/nmo.12366.
- Werner Nicklas, Adrian Deeny, Piet Diercks, Alberto Gobbi, Brunhilde Illgen-Wilcke, Michel Seidelin. (2010) FELASA guidelines for the accreditation of health monitoring programs and testing laboratories involved in health monitoring *Lab Anim (NY)* 39(2): 43-8. doi: 10.1038/labani0210-43

CAPÍTULO 9

Enfermedades infecciosas de pequeños roedores de experimentación

Miguel Ángel Ayala

Enfermedades bacterianas que afectan el aparato respiratorio

Bordetella bronchiseptica

Es un bacillo Gram negativo, pleomórfico, corto, fácilmente cultivable, naturalmente se presenta en varias especies como rata, ratón, cobayo, hámster, merión, conejo y cerdo; puede producir infecciones cruzadas. Causa una enfermedad respiratoria de prevalencia y severidad variable según la especie afectada. Las lesiones y los signos clínicos suelen acentuarse más en animales jóvenes e inmunodeprimidos y especialmente en la infección simultánea con otros patógenos o en condiciones ambientales desfavorables. En los cobayos se suelen observar los signos clínicos de la enfermedad, mientras que en los otros roedores pasa en forma inaparente (Deeb B.1990).

Organotropismo: mucosa nasal, conjuntival, árbol bronquial y aparato genital.

Signos clínicos: los portadores inaparentes son comunes. En las ratas y cobayos se pueden observar signos respiratorios con descarga nasal y lagrimal purulenta, disnea y muerte súbita.

Lesiones: inflamación purulenta de la mucosa respiratoria, rinitis, traqueítis, bronquitis, y bronconeumonía, neumonía intersticial, conjuntivitis y otitis media. En genital puede dar nacimientos prematuros, mortandad perinatal y abortos y en cobayos puede producir piometras.

Diagnóstico: Cultivo bacteriano, Aglutinación en placa, PCR.

Control: Técnica de histerectomía o trasplante de embriones.

Interferencia con la investigación: Interfieren en estudios del aparato respiratorio y otorrinolaringología, incluyendo modelos de infección respiratoria.

CAR Bacillus (*Bacilo asociado a las cilias del aparato respiratorio*)

También llamado *Filobacterium rodentium*, es un bacilo filamentoso Gram negativo cuya clasificación todavía no es muy clara. No crece en medios de cultivos bacterianos convenciona-

les. Afecta varias especies, rata, ratón, hámster, merión, conejo, cerdo y rumiantes. La transmisión es por contacto directo o secreciones de la mucosa respiratoria. Puede ser un patógeno primario o estar asociado con otros patógenos respiratorios tales como *Mycoplasma pulmonis*, *Bordetella bronchiseptica* o virus Sendai. (Brogden K A, 1993)

Organotropismo: epitelio ciliado del aparato respiratorio.

Signos clínicos: disnea, secreción nasal y pérdida de peso.

Lesiones: inflamación de grado variable de las vías aéreas, bronquiectasias, atelectasias y abscesos en lóbulos pulmonares. Afecciones del oído medio.

Diagnóstico: PCR, IFI, tinción con sales de plata.

Control: Técnica de histerectomía o trasplante de embriones.

Interferencia con la investigación: Interfieren en estudios de fisiología del aparato respiratorio y otorrinolaringología, incluyendo modelos de infección respiratoria, sinusitis y otitis experimental.

Klebsiella spp.

Es un bacilo Gram negativo comensal del tracto respiratorio y digestivo de roedores, conejos y otros animales, tanto *Klebsiella oxytoca* y *Klebsiella pneumoniae* son consideradas patógenos oportunistas. Pueden ser patógenos primarios en animales inmunodeprimidos. La transmisión es oral-fecal y la prevalencia en las colonias puede ser variable, pudiendo aumentar si se usan antibióticos (Baillie M B 1996, White W. 1998).

Organotropismo: aparato respiratorio y genital.

Signos clínicos: disnea, linfadenopatía cervical y pérdida de peso.

Lesiones: inflamación de los ganglios linfáticos, rinitis, neumonía e inflamación del aparato genital de las hembras.

Diagnóstico: cultivo bacteriano.

Control: Técnica de histerectomía o trasplante de embriones.

Interferencia con la investigación: Interfieren en estudios de fisiología del aparato respiratorio y genital. Altera la farmacocinética de los antibióticos.

Mycoplasma pulmonis

Es una bacteria pleomórfica de pequeño tamaño que carece de pared y tiene actividad hemolítica asociada a la membrana. En la rata es el patógeno más importante y produce la enfermedad respiratoria crónica. La prevalencia es alta. La vía de transmisión más importante es horizontal y directa, también se disemina por infección intrauterina o luego del parto, ya que produce infecciones del aparato genital. Se transmite por fómites contaminados, cultivos celulares o reactivos y materiales biológicos contaminados. La infección se establece de manera rápida en la mucosa nasofaríngea y en el oído (Cartner S C 1995, 1996)

Organotropismo: aparato respiratorio y genital. En animales inmunodeficientes puede afectar las articulaciones (Davis J K, 1991).

Signos clínicos: disnea, ruidos respiratorios, pérdida de peso y letargia. En las ratas se puede observar secreción de porfirinas alrededor de los ojos y fosas nasales. Si está afectado el oído medio pueden aparecer signos vestibulares con la cabeza inclinada de lado, marcha tambaleante y movimiento circular. Baja de fertilidad en las colonias de producción. El ratón cursa en forma asintomática. (Zuñiga 2017)

Lesiones: *Mycoplasma* coloniza el epitelio respiratorio de las vías aéreas causando una inflamación severa que se extiende al pulmón con consolidación progresiva y confluyente. Se observa en las vías aéreas un exudado sumamente viscoso. Este patógeno provoca una acentuada respuesta inmunológica que si bien protege a los animales inmunocompetentes de la infección sistemática no logra eliminar la bacteria. En los animales inmunodeprimidos la enfermedad generalmente es mortal. (Cassell GH 1982).

Diagnóstico: cultivo bacteriano, IFI, PCR.

Control: Técnica de trasplante de embriones.

Interferencia con la investigación: Interfieren en estudios de fisiología del aparato respiratorio, inmunológico y genital y contamina los cultivos celulares.

Pasteurella pneurotrópica

Es un cocobacilo Gram negativo. Se presenta en forma subclínica y su prevalencia es alta. La transmisión es por contacto directo. Naturalmente afecta a la rata y ratón, hámster (Boot R 1995).

Organotropismo: mucosa nasofaríngea, conjuntiva, intestino y aparato genital

Signos clínicos: La mayoría de los animales cursa en forma asintomática, pero en animales inmunocomprometidos se pueden observar procesos supurativos, abscesos y mortalidad elevada.

Lesiones: rinitis, conjuntivitis, abscesos peri orbitales, en piel o prepuciales. Se observa en los animales inmunocompetentes abortos, muertes fetales y de crías recién nacidas. Produce infertilidad

Diagnóstico: cultivo bacteriano.

Control: Técnica de histerectomía y trasplante de embriones.

Interferencia con la investigación: Interfieren en estudios de fisiología del aparato respiratorio y genital. Interfiere en la producción de ratones en las colonias de producción.

Streptococcus pneumoniae

Es un diplococo Gram positivo con capsula, común en la rata y cobayo, se transmite por aerosol a partir de animales o humanos infectados con este agente. (Arva E 1996)

Organotropismo: mucosa nasofaríngea, oído, pulmón membrana serosas.

Signos clínicos: disnea, pérdida de peso y xifosis. Se puede observar secreción nasal y ocular.

Lesiones: rinitis supurativa y otitis media. Edema pulmonar con secreción purulenta colecta entre las membranas pleurales, pericardio y septicemia. Abscesos en diferentes órganos. (Ilback N G 1991).

Diagnóstico: cultivo bacteriano.

Control: Técnica de histerectomía y trasplante de embriones.

Interferencia con la investigación: Interfieren en estudios de fisiología del aparato respiratorio y genital.

Enfermedades bacterianas que afectan el aparato digestivo

Citrobacter rodentium

Es el agente productor de la hiperplasia colónica transmisible murina. Es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de baja prevalencia. La trasmisión es por contacto directo fecal-oral. Naturalmente infecta al ratón. (Barthold S 1978, 1976)

Organotropismo: intestino, colon y ciego.

Signos clínicos: son inespecíficos, incluyen pérdida de peso, depresión, aturdimiento, heces blandas que se adhieren a la región perianal y prolapso rectal.

Lesiones: Coloniza en forma transitoria la mucosa intestinal. Se puede observar hiperplasia del colon.

Diagnóstico: cultivo bacteriano.

Control: Técnica de histerectomía y trasplante de embriones.

Interferencia con la investigación: interfieren en estudios del aparato digestivo, principalmente intestinos, colon y ciego. El uso de antibióticos puede producir los signos clínicos.

Clostridium piliforme

Es un bacilo filamentoso, Gram negativo que causa la enfermedad de Tyzzer. Este patógeno no crece en medios de cultivos convencionales y forma esporas resistentes y capaces de sobrevivir largo tiempo en el ambiente. La prevalencia es variable en colonias de roedores, pudiendo ser alta en brotes de la enfermedad (Allen A M 1965). Posee una am-

plia gama de huéspedes susceptibles. La transmisión tiene lugar por la ingestión de esporas que se depositan con las heces en la cama de los animales y pueden contaminar el agua y el alimento. (Ayala M 2010)

Organotropismo: intestino, hígado y corazón.

Signos clínicos: varía dependiendo de factores del huésped como especie, cepa, edad, estado del sistema inmune. En ratón, hámster y merión son rápidamente letales, mientras que en rata puede predominar la forma subclínica. Puede producir diarrea, letargia, pelo hirsuto, xifosis, pérdida de peso y muerte.

Lesiones: Coloniza inicialmente el ileo, ciego y linfocitos regionales, luego pasa al hígado a través del sistema porta y por medio del torrente sanguíneo invade otros tejidos como el miocardio. Se observa el intestino engrosado, edematosos e hiperémico y con frecuencia se encuentran focos de necrosis diminutos en la mucosa y petequias o hemorragias en la serosa. El contenido intestinal tiene un aspecto acuoso y de color marrón más severos a nivel del colon y ciego. El hígado, al igual que el corazón, presenta pequeños focos de necróticos.

Diagnóstico: IFI, tinciones de Giemsa, verde de malaquita, sales de plata y PCR.

Control: Técnica de histerectomía y trasplante de embriones.

Interferencia con la investigación: interfieren en estudios del aparato digestivo, principalmente intestino, colon y ciego. Alteración de la farmacocinética de los antibióticos y enzimas hepáticas.

Corynebacterium kutscheri

Es un coco bacilo Gram positivo causal de la pseudotuberculosis murina. Si a los animales se los somete a procedimientos experimentales que los inmunodeprimen puede provocar la enfermedad en portadores que albergan la bacteria de modo latente. La transmisión es fecal oral y el bacilo coloniza la mucosa bucofaríngea e intestino grueso y se disemina por sangre a linfocitos e hígado en el ratón y a otros órganos como el pulmón en el caso de la rata (Amao 1995).

Organotropismo: mucosa bucofaríngea e intestino grueso.

Signos clínicos: La enfermedad cursa en forma inaparente, en animales inmunodeprimidos se puede observar una masa en la zona submandibular por agrandamiento de los ganglios. Algunos ratones suelen presentar inflamación de las articulaciones distales de los miembros.

Lesiones: Abscesos con contenido caseoso y granulomas en distintos órganos, linfadenitis y artritis o poliartritis supurativa.

Diagnóstico: Cultivo bacteriano, Aglutinación en placa, PCR.

Control: Técnica de histerectomía y trasplante de embriones.

Interferencia con la investigación: La pseudotuberculosis murina puede interferir con experimentos que incluyan inmunosupresión. En estudios de inmunología, inflamación o infecciones experimentales y en la fisiopatología digestiva y respiratoria en el caso de la rata.

Helicobacter spp.

Son microorganismos Gram negativos, espiralados, microaerófilos difíciles de cultivar. Se localizan en intestino grueso y se excretan a través de las heces por lo que el contagio es fecal-oral. Son comensales en los animales inmunocompetentes, pero en los ratones como por ejemplo la cepa A/J, que posee una alta susceptibilidad, sufren de tiflitis. En los animales inmunodeprimidos se suelen observar patologías a nivel intestinal, hígado y vías biliares. El más prevalente es el *Helicobacter hepaticus* dando patologías en intestino e hígado. Se lo han aislado de rata, ratón, hámster y recientemente del merión (Fox, J.G. 1997, Livingston, R.S 1997.).

Organotropismo: mucosa intestinal y secundariamente hígado.

Signos clínicos: Los animales inmunocompetentes no presentan signos clínicos, pero en los animales inmunodeprimidos o animales transgénicos se puede observar heces blandas, pegajosas, prolapso rectal y reducción de la fertilidad.

Lesiones: Coloniza la mucosa del colon y ciego de forma permanente, pero sin dar lesiones. En ciertos casos causa una inflamación del intestino grueso con hiperplasia de la mucosa y prolapso rectal. Cuando coloniza el hígado se pueden observar abscesos hepáticos y en ratones de edad avanzada puede producir adenocarcinoma de colon y tumores hepáticos.

Control: Técnica de histerectomía.

Diagnóstico: PCR

Interferencia con la investigación: No se deben usar en estudios de inmunología, gástricos y del aparato digestivo, suele alterar las enzimas hepáticas. En ratones transgénicos puede modificar el fenotipo de los mismos.

Pseudomonas aeruginosa

Es un bacilo Gram negativo habitante normal de la mucosa nasofaríngea y del intestino grueso de la mayoría de los mamíferos, también se la puede encontrar en el agua, desechos orgánicos y la tierra. Forma parte de la flora normal de la piel. El modo de transmisión es por contacto directo con animales contaminados, agua, alimento, cama y seres humanos. (White W., 1998)

Organotropismo: mucosa nasofaríngea, oído medio.

Signos clínicos: En animales inmunodeprimidos se manifiesta con xifosis, apatía, respiración entrecortada, pelo hirsuto, emaciación y movimientos circulares.

Lesiones: Se distribuye por vía hematógena, causando septicemia, necrosis multifocal, abscesos y lesiones supurativas.

Control: Técnica de histerectomía y trasplante de embriones.

Diagnóstico: cultivo bacteriano.

Interferencia con la investigación: Produce la muerte en animales sometidos a irradiación. Cuando hay trauma de las vías respiratorias aumenta la severidad de la infección. Complicaciones con mortalidad elevada por infección post-quirúrgica.

Salmonella spp.

Son bacilos Gram negativos que colonizan el tracto digestivo de numerosos huéspedes. Es una zoonosis. La prevalencia en pequeños roedores de laboratorio es muy baja. El contagio se produce cuando al bioterio ingresan roedores silvestres y contaminan con sus deyecciones el agua, alimento y cama, también puede ingresar a través del personal. Los serotipos más comúnmente aislados son ***Salmonella enteritidis*** y ***tiphimurium***. (Fallon M 1991) La sensibilidad a la enfermedad está determinada por tres locus, por lo que las cepas co isogénicas son más susceptibles.

Organotropismo: intestino, linfo nódulos, hígado y bazo.

Signos clínicos: diarrea, pérdida de peso, pelo hirsuto, decaimiento, xifosis, letargo, pero la severidad de la infección depende del serotipo y cepa de *Salmonella*, así como de la dosis de infección, genotipo, edad y estado inmunológico del huésped, la composición de la flora intestinal, estado nutricional, infecciones recurrentes y estrés del hospedador.

Lesiones: Invade la mucosa entérica a nivel de las placas de Peyer donde se multiplica y es fagocitada por macrófagos que la transportan a los linfo nódulos mesentéricos. Desde allí se distribuye por el organismo y pasa a los órganos afectados que son el intestino delgado terminal, el grueso, linfo nódulos, hígado y bazo. Sobrevive indefinidamente en los macrófagos de los animales infectados. Las lesiones más comunes son necrosis focal, inflamación poli granulomatosa, hiperplasia de las criptas intestinales, septicemia y focos de necrosis en el hígado y bazo.

Control: Técnica de histerectomía y trasplante de embriones.

Diagnóstico: cultivo bacteriano.

Interferencia con la investigación: Por ser una zoonosis no se deben utilizar estos animales bajo ningún aspecto.

Streptobacillus moniliformis

Es una bacteria Gram negativa, causante de la zoonosis de la mordedura por la rata, que asemeja una intoxicación alimentaria. Son bastones cortos o formas filamentosas alargadas. (Arva E 1996)

Organotropismo: mucosa nasofaríngea.

Signos clínicos: La rata es un portador inaparente Lesiones: No se observan lesiones.

Control: Técnica de histerectomía y trasplante de embriones.

Diagnóstico: cultivo bacteriano.

Interferencia con la investigación: Por ser una zoonosis no se deben utilizar estos animales bajo ningún aspecto.

Enfermedades bacterianas que afectan la piel y tegumentos

Corynebacterium bovis

Es una bacteria Gram positivo, causante de dermatitis hiperquerotósica en ratones desnudos. (Clifford, C.B 1995, White W.,1998))

Organotropismo: piel, mucosa bucal.

Signos clínicos: Los ratones inmunocompetentes pueden ser portadores sanos o con signos clínicos de leves y de poca duración. Los ratones desnudos, en especial las crías, desarrollan dermatitis hiperqueratósica severa.

Lesiones: la característica histológica de esta enfermedad es el contraste entre la marcada hiperplasia de la epidermis con severa hiperqueratosis y la leve infiltración leucocitaria.

Control: Técnica de histerectomía y trasplante de embriones.

Diagnóstico: cultivo bacteriano y PCR

Interferencia con la investigación: No se pueden usar ratones nude (desnudos) con esta enfermedad en trasplantes con tumores.

Staphylococcus aureus

Es un coco Gram positivo, beta hemolítico y coagulasa positiva que pertenece a la flora normal de las vías aéreas superiores, piel e intestino grueso de humanos y numerosas especies animales. Es un patógeno oportunista que se transmite de forma directa (Bailey C J 1995, White W.,1998).

Organotropismo: piel y faneras.

Signos clínicos: son variados, se han aislado de lesiones de piel de la cola, dermatitis ulcerativa, abscesos peri orbitales o de las glándulas prepucciales.

Lesiones: la lesión típica es una inflamación supurativa con ulceración cutánea o formación de abscesos en cualquier órgano. Suele haber linfadenopatía regional.

Control: Técnica de histerectomía y trasplante de embriones.

Diagnóstico: cultivo bacteriano.

Interferencia con la investigación: Este agente produce diferentes enzimas y productos biológicos como la hemolisina, nucleasas, coagulasa, lipasas, etc. por lo que produce un amplio espectro de complicaciones en los procedimientos y alteración en los resultados de investigaciones.

Enfermedades virales que afectan el aparato respiratorio

Virus de la neumonía del ratón (PVM).

Es un virus ARN, pertenece a la familia paramyxoviridae. Afecta a ratones, ratas, hámsters, cobayos y conejos y de mayor frecuencia en ratas que en ratones. La transmisión es por aerosol o exposición directa de la mucosa del tracto respiratorio. No es muy contagioso por lo que la prevalencia es baja y se inactiva rápidamente en el medio ambiente. (Arva E 1996)

Organotropismo: pulmón

Signos clínicos: los animales inmunocompetentes no muestran signos clínicos, pero en los inmunodeficientes se puede observar disnea, neumonía, cianosis, pérdida de peso, emaciación y alta mortalidad.

Lesiones: puede producir rinitis necrotizante, bronquiolitis y neumonía intersticial no supurativa. La co infección con otros agentes patógenos agrava la enfermedad.

Control: Técnica de histerectomía y trasplante de embriones.

Diagnóstico: IFI y PCR.

Interferencia con la investigación: Produce hidrocefalia en ratas y ratones recién nacidos. No se pueden usar en estudios del aparato respiratorio, inmunológicos o que requieran inmunodeprimir a los animales.

Virus de la parainfluenza 3 del cobayo (PIV 3)

Es un ARN virus, que pertenece a la familia paramyxoviridae que tiene homología con el PIV 3 que afecta al humano y bovino

Organotropismo: pulmón

Signos clínicos: no hay signos clínicos, pero puede haber mortandad de cobayos sometidos a anestesia por vía inhalatoria.

Lesiones: se puede observar neumonía intersticial o bronconeumonía aguda o crónica.

Control: Técnica de histerectomía y trasplante de embriones (Reetz, J.C 1988, Rouleau A 1993 Vitale N 1998).

Diagnóstico: IFI y PCR

Interferencia con la investigación: No se pueden usar en estudios del aparato respiratorio o si se va a utilizar anestesia inhalatoria.

Virus Sendai

Es un ARN virus clasificado como Parainfluenza 1, es patógeno para ratas, ratones, hámster, cobayo y merión. Es de alta prevalencia en colonias de roedores. La transmisión es por contacto directo y vías respiratorias a través de aerosoles. Puede presentarse como enzootia o epizootia dependiendo de la cepa viral y de la edad, sexo, cepa, estado inmunitario y patógeno adicionales del huésped. Los ratones son más sensibles que las ratas. Es un virus auto limitante.

Organotropismo: aparato respiratorio (Carthew P 1980)

Signos clínicos: en general es inaparente, sólo se aprecia retraso en el crecimiento de las crías. La mortalidad aumenta en presencia de otros agentes infecciosos como *Mycoplasma pulmonis* o *Pasteurella pneurotrópica*. Se puede observar pelo hirsuto, disnea y en ratas jóvenes causa hipoxia.

Lesiones: El virus lesiona el epitelio respiratorio y alveolar, histológicamente se pueden observar hipertrofia, formación de células multinucleadas y cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos. Consolidación pulmonar con hepatización roja y luego gris.

Control: Técnica de histerectomía y trasplante de embriones.

Diagnóstico: IFI y PCR.

Interferencia con la investigación: No se pueden usar en estudios del aparato respiratorio, inmunológico o si se tienen que inmunodeprimir animales ya que altera fuertemente el sistema inmune.

Enfermedades virales que afectan el aparato digestivo

Virus de la hepatitis del ratón

Es un ARN virus que pertenece a la familia coronaviridae, donde se describieron 25 cepas y dos biotipos principales según su tropismo tisular. Produce reacción cruzada con coronavirus de la rata, humanos, bovinos y porcinos. Es altamente contagioso y se transmite por contacto directo, fómites y a través de materiales biológicos como tumores trasplantados. (Barthold S 1993, 1992, 1990 FELASA 1992 NRC 1991)

Organotropismo: varía de acuerdo con la cepa viral. Algunas tienen afinidad por los intestinos (enterotrópico) y otras por otros tejidos (biotipo politrópico).

Signos clínicos: la gravedad depende de la cepa viral y factores como edad, cepa y estado inmunitario de los animales. Los signos clínicos se pueden observar en las crías, mientras que en los adultos la enfermedad es inaparente. En las crías se puede observar diarrea, deshidratación, pérdida de peso, parálisis de los cuartos traseros y muerte. En las colonias vírgenes producen una epizootia aguda que afecta a las crías, pero se sustituye por un patrón asintomático a medida que la población se va inmunizando (Casebolt D. 1997)

Lesiones: las lesiones más graves se presentan en ratones inmunodeficientes que pueden sufrir un curso fulminante que conduce a la emaciación y muerte. Las cepas politrópicas se replican inicialmente en la mucosa nasal y se diseminan por vía hemo linfática reproduciéndose en los endotelios y múltiples órganos donde causan necrosis aguda con formación de sincitios. En los neonatos causa encefalomiелitis y desmielinización.

Las cepas enterotrópicas tienen una replicación en el intestino incluyendo las placas de Peyer, dando lugar a enterocolitis en las crías.

Control: Técnica de histerectomía o trasplante de embriones, como es un virus autolimitante se recomienda evitar la entrada de animales susceptibles a la colonia de experimentación o suspender la cría por 8 semanas.

Diagnóstico: IFI, PCR.

Interferencia con la investigación: No se pueden usar en estudios del aparato digestivo o si se tienen que inmunodeprimir animales y en estudios inmunológicos ya que altera el sistema inmune, contamina los tumores trasplantados y causa rechazo a los xenoinjertos.

Parker Corona virus de la rata y Virus de la Sialodacryoadenitis de la rata.

Afecta a ratas inmunocompetentes y la enfermedad se puede presentar desde su forma subclínica o con signos clínicos evidentes. Los neonatos y ratas inmunodeficientes sufren un curso más severo de la enfermedad. El contagio es por contacto directo a través de secreciones nasales, oculares, saliva y fómites (FELASA 1992 NRC 1991).

Organotropismo: glándulas salivares, lagrimales y mucosa respiratoria.

Signos clínicos: puede cursar como una enzootia de manera asintomática o con signos clínicos oculares leves. En forma epizootica puede observarse una descarga nasal y ocular, tumefacción de la zona mandibular por las glándulas salivares hinchadas. La destrucción del epitelio lagrimal libera cantidades excesivas de porfirinas que colorean de rojo oscuro las lágrimas y el pelaje. Puede haber fotofobia, exoftalmia y muerte inesperada en ratas sujetas a anestesia inhalatoria.

Lesiones: Hipertrofia y edema de las glándulas salivares y lagrimales. Necrosis coagulativa de los acinos glandulares y conductos excretorios y finalmente un exudado inflamatorio y posteriormente reparativo. Inflamación de linfocitos y mucosa nasal. La lesión de las glándulas lagrimales interfiere con la producción de lágrimas dando lugar a la aparición de conjuntivitis y úlceras corneales.

Control: Técnica de histerectomía o trasplante de embriones, como es un virus autolimitante evitar la entrada de animales susceptibles a la colonia de experimentación o suspender la cría por 8 semanas.

Diagnóstico: IFI, PCR.

Interferencia con la investigación: No se pueden usar en estudios del aparato digestivo y respiratorio, ojos, glándulas salivares y lagrimales. O si se tienen que inmunodeprimir animales

y en estudios inmunológicos ya que altera el sistema inmune. Altera la función olfativa y la curva de crecimiento.

Rotavirus

Es un ARN virus que pertenece a la familia *Reoviridae*, afecta al ratón, conejo y humanos. Es la causante de la entidad conocida como Diarrea Epizootica del ratón infantil y rata infantil (EDIM y EDIR). La infección afecta a ratones y ratas de cualquier edad, pero la manifiesta en las crías hasta las 2 semanas de edad y en animales inmunodeficientes. La transmisión es por contacto directo con el virus por vía oral y se excreta en las heces, pero también se dispersa por vía aérea (Eiden J. 1986).

Organotropismo: epitelio intestinal

Signos clínicos: diarrea amarilla grisácea con esteatorrea, con pelo hirsuto y aceitoso, distensión abdominal y letargo. Retraso en el crecimiento de las crías.

Lesiones: el intestino puede aparecer dilatado, con contenido líquido y abundante gas. Histológicamente aparecen los enterocitos vacuolados con núcleo picnótico.

Control: Técnica de histerectomía o trasplante de embriones.

Diagnóstico: IFI y PCR

Interferencia con la investigación: No se pueden usar en estudios del aparato digestivo.

Reovirus tipo 3

Es un ARN virus que pertenece a la familia *Reoviridae*, afecta a todas las especies de animales de laboratorio. La transmisión es por contacto directo con el virus por vía oral y se excreta en las heces, pero también se dispersa por vía aérea (Cook I.1963, Sheboul 1996).

Organotropismo: epitelio intestinal

Signos clínicos: diarrea, con pelo hirsuto y alopecia abdominal, ictericia. Retraso en el crecimiento de las crías.

Lesiones: produce necrosis hepática y a la necropsia se puede observar el riñón amarillo.

Control: Técnica de histerectomía o trasplante de embriones.

Diagnóstico: IF, ELISA y PCR

Interferencia con la investigación: No se pueden usar en estudios del aparato digestivo.

Norovirus del ratón

El norovirus murino es un virus ARN monocatenario, desnudo, que pertenece a la familia *Caliciviridae* relacionado con los norovirus humanos tipo Norwalk-like. La transmisión es por

contacto directo oro fecal o través de fómites contaminados. Naturalmente afecta al ratón y es de muy alta prevalencia.

Organotropismo: es un virus politrópico

Signos clínicos: cuando la enfermedad tiene un curso agudo causa enteritis leve, seguida de una rápida recuperación en animales inmunocompetentes. En ratones inmunocomprometidos se puede observar encefalitis, meningitis, vasculitis cerebral, neumonía intersticial focal, peritonitis, pleuritis y hepatitis.

Control: Técnica de histerectomía o trasplante de embriones.

Diagnóstico: PCR

Interferencia con la investigación: No se pueden usar en estudios del aparato digestivo ni inmunológico.

Enfermedades virales que afectan al sistema nervioso central

Enfermedad de Theiler (encefalomielitis murina)

Es un virus ARN perteneciente a la familia Picornaviridae, afecta principalmente a los ratones, pero se encontró serología positiva en rata, cobayo y hámster. La virulencia varía con la cepa viral.

Organotropismo: intestino y esporádicamente el sistema nervioso central. El virus se excreta con las heces y se adquiere por ingestión de materiales contaminados con el mismo.

Signos clínicos: cursan sin signos clínicos aparentes, aunque las cepas neurovirulentas pueden causar encefalitis linfocítica aguda con curso mortal en un número bajo de animales. Las cepas menos virulentas siguen con un curso bifásico, inicialmente poliomielitis aguda y más tarde con desmielinación mediada por autoinmunidad, observándose una parálisis flácida durante la fase inicial de poliomielitis y luego signos nerviosos con ataxia, espasmos, temblores e incontinencia. (Arva E 1996).

Lesiones: No hay cambios macroscópicos en el SNC, los hallazgos histopatológicos incluyen encefalitis aguda, poliomielitis, meningitis no supurativa y desmielinización.

Control: Técnica de histerectomía o trasplante de embriones

Diagnóstico: IFI y PCR.

Interferencia con la investigación: No se pueden usar en estudios sobre el sistema nervioso central.

Coriomeningitis linfocitaria

La Coriomeningitis linfocitaria la produce un virus ARN que pertenece a la familia *Arenaviridae*. Afecta al ratón, rata, gerbo y hámster. Es un virus zoonótico que puede causar una grave

enfermedad en el humano. Se transmite por vía oral y a través de la vía transplacentaria. (FELASA 1992 NRC 1991).

Organotropismo: es un virus politrópico, pero afecta principalmente hígado, riñón, glándulas salivares, sistema hematopoyético y sistema nervioso central.

Signos clínicos: El curso de la infección y los signos clínicos dependen de la cepa viral, el número de partículas virales y de la puerta de entrada del virus, así como de la especie, cepa, edad y estado inmunitario de animal infectado. El curso de la enfermedad se puede presentar de 4 formas diferentes:

1. La infección durante la vida intrauterina o neonatal permite el desarrollo de tolerancia. El virus no causa efectos citopatogénicos y persiste en múltiples tejidos de modo latente.
2. El estado de tolerancia se puede romper durante la edad adulta, lo que da lugar a una respuesta inmunológica con lesiones inflamatorias en distintos órganos (enfermedad tardía).
3. La infección intrauterina o neonatal puede asentarse en glándulas endocrinas causando deficiencias hormonales que se evidencian por falta de crecimiento o emaciación.
4. La infección en ratones adultos inmunocompetentes genera una reacción inflamatoria.

Lesiones: Son mediadas por sistema inmunitario que reacciona con las células infectadas con el virus, se puede observar glomerulonefritis mediada por inmunocomplejos, lesiones inflamatorias en el hígado y encefalitis linfocítica severa.

Control: trasplante de embriones (Reetz, J.C 1988, Rouleau A 1993 Vitale N 1998).

Diagnóstico: PCR

Interferencia con la investigación: Los animales infectados con este virus no deben utilizarse por ser una grave enfermedad zoonótica y por lo tanto esta indicada la eutanasia de la totalidad de la colonia.

Enfermedades virales que afectan a múltiples aparatos

Adenovirus del ratón

Es un ADN virus que pertenece a la familia *adenoviridae*, afecta a numerosas especies con curso inaparente hasta la enfermedad mortal. Hay dos cepas virales descritas: MAd-1, cepa FL Tipo 1 y Mad-2 cepa K87 Tipo 2. La frecuencia es baja y se trasmite por contacto directo (Blailock Z R 1967, FELASA 1992 NRC 1991).

Organotropismo: MAd-1 es politrópico y persistente, experimentalmente tiene tropismos por SNC, causando muerte, mientras que Mad-2 es enterotrópico.

Signos clínicos: inaparentes en infecciones experimentales.

Lesiones: naturalmente no se observan, en forma experimental con el biotipo MAd-1 se pueden observar temblores, ataxia y parálisis. Afecta la medula espinal, intestinos, páncreas, corazón, riñones y adrenales y aparecen focos necróticos. El virus puede excretarse por nume-

rosas vías. En la infección por Mad-2 es inaparente, aunque se ha observado emaciación de las crías. Se elimina con la materia fecal durante 3 semanas en animales inmunocompetentes y 6 meses en inmunodeprimidos. Afecta solo intestino, donde se pueden observar cuerpos de inclusión en las criptas y vellosidades.

Control: Técnica de histerectomía. o trasplante de embriones (Reetz, J.C 1988, Rouleau A 1993 Vitale N 1998).

Diagnóstico: IFI y PCR.

Interferencia con la investigación: No se pueden usar en estudios sobre SNC y aparato digestivo.

Parvovirus del ratón

Es un ADN virus que pertenece a la familia *Parvoviridae*. La prevalencia es alta y no manifiesta signos clínicos. Se lo conoce también como virus diminuto del ratón. Puede ser letal para algunas cepas de ratones como BALB7c y DBA/2.(Ball-Goodrich L J 1994)

Organotropismo: la infección natural en ratones inmunocompetentes es breve y se restringe al intestino delgado, tejidos linfáticos y riñón. Experimentalmente, puede haber replicación multisistémica, incluyendo SNC, la placenta y el feto.

Signos clínicos: Las lesiones y signos se observan en inoculaciones en forma experimental.

Control: trasplante de embriones. (Reetz, J.C 1988, Rouleau A 1993 Vitale N 1998).

Diagnóstico: IFI o PCR.

Interferencia con la investigación: No se pueden usar en estudios del SNC y digestivos

Parvovirus de la rata. Virus Kilham de la rata

Es más común que H-1, se trasmite por contacto directo a través de orina, heces, secreciones nasales, leche y fómites, además de por vía transplacentaria. Persiste largo tiempo, dependiendo entre otros factores de la edad en la que se produce la infección natural(FELASA 1992 NRC 1991, Ball-Goodrich L J 1994).

Organotropismo: replica en múltiples tejidos en desarrollo.

Signos clínicos: es asintomático. Se puede observar reabsorción de fetos y esterilidad. Las crías infectadas experimentalmente presentan signos variados ataxia, ictericia, distensión abdominal, deshidratación y muerte.

Lesiones: afecta al SNC y aparato gastrointestinal, respiratorio y urogenital. La afinidad del virus por el endotelio vascular y la destrucción de megacariocitos de la médula ósea dan hemorragias en múltiples tejidos. También se puede observar necrosis focal en el hígado, SNC, pulmón, riñón y testículos En hembras preñadas se puede producir una reabsorción de embriones o aborto y en los neonatos hipoplasia cerebelosa.

Control: trasplante de embriones. (Reetz, J.C 1988, Rouleau A 1993 Vitale N 1998).

Diagnóstico: IFI e Inhibición de la hemoaglutinación y PCR.

Interferencia con la investigación: Contamina líneas celulares e inhibe la formación de xenotrasplantes. Causa muerte fetal y malformaciones congénitas.

Virus Toolan de la rata (H1)

Afecta naturalmente a la rata y experimentalmente al hámster. Se han encontrado anticuerpo en el hombre. La transmisión es directa, a través de la exposición de orina infectada y secreciones nasales ((FELASA 1992 NRC 1991, Ball-Goodrich L J 1994).

Signos clínicos y lesiones: Naturalmente los animales cursan en forma subclínica la enfermedad y no se observan lesiones.

Control: trasplante de embriones. (Reetz, J.C 1988, Rouleau A 1993 Vitale N 1998).

Diagnóstico: IFI e Inhibición de la hemoaglutinación y PCR.

Interferencia con la investigación: Contamina líneas celulares e inhibe la formación de xenotrasplantes. Causa muerte fetal y malformaciones congénitas.

Viruela del ratón

Es un ADN virus que pertenece a la familia *Poxviridae*. Las partículas virales son grandes y afecta al ratón. Es el agente causal de la ectromelia del ratón. La infección es poco frecuente, pero en colonias vírgenes ha habido brotes esporádicos (Dick E J. 1996). Se transmite por contacto directo o fómites contaminados a través de heridas de la piel. En los ratones hay cepas más resistentes, C57 y otras más susceptibles como la BALB/c (FELASA 1992 NRC 1991).

Organotropismo: tiene carácter politrópico, dando lesiones a múltiples órganos.

Signos clínicos: la piel presenta hiperemia, edema, necrosis y úlceras que en caso severo llevan a la amputación de las extremidades y cola. Se puede observar conjuntivitis.

Lesiones: lesiones en piel ulceradas, hiperémicas y edematosas. Hay hepato y esplenomegalia. Histológicamente se observan lesiones necróticas en cuya vecindad puede haber cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos.

Control: Técnica de histerectomía.

Diagnóstico: IFI y PCR.

Interferencia con la investigación: Los animales infectados con este patógeno no deben utilizarse y una vez hecho el diagnóstico se deben sacrificar y refundar la colonia debido a la gravedad de la enfermedad.

Enfermedades causadas por hongos

Dermatofitos

Es de baja prevalencia, en ocasiones, se ha descubierto que los ratones y ratas de laboratorio son portadores inaparentes de dermatofitos y, en raras ocasiones, se ha informado que presentan dermatomicosis clínica (tiña), muy pocas colonias infectadas han causado infección en las personas que trabajan con ellos (FELASA 1992 NRC 1991).

Agentes etiológicos: son hongos, que pertenecen a la clase Deuteromycetes (Fungi Imperfecti), géneros *Trichophyton* y *Microsporum*.

El *Trichophyton mentagrophytes* es el que se aisló con mayor frecuencia de infecciones subclínicas o dermatomicosis de ratas y ratones.

También se han aislado del pelaje de ratas y ratones otras especies tales como *Trichophyton ajelloi*, *T. schoenleini*, *T. terrestre*, *Microsporum gallinae*, *M. gypseum* y *M. cookei*. (Connole M D. 1990).

Naturalmente infectan a ratones, ratas, personas y muchas otras especies de animales.

Organotropismo: Estos agentes patógenos son parásitos de la queratina, es decir, cabello y capas superficiales de piel

Signos clínicos: cursan en forma subclínica, cuando los animales se someten a inmunodepresión o procesos de estrés pueden observarse los signos clínicos como prurito.

Lesiones: consisten en áreas de alopecia definidas escamosa o de aspecto costroso y pústulas ocasionales en los bordes. La mayoría de las lesiones se observan en la cabeza cerca de la boca y los ojos, pero también se pueden ver en cualquier parte del cuerpo. Microscópicamente encontramos solo un engrosamiento del estrato córneo en cortes teñidos con hematoxilina y eosina. En los casos más severos puede haber hipertrofia de la epidermis con diversos grados de inflamación aguda y crónica de la dermis.

Control: técnica de histerectomía o trasplante de embriones.

Diagnóstico: Para la detección del agente patógeno de cepilla el pelaje de los animales sobre placas abiertas con el medio de cultivo y luego, estas placas se cultivan en busca de dermatofitos.

Se puede hacer un raspado de piel en la zona donde se observan lesiones, en la periferia de las mismas y se monta en portaobjetos con hidróxido de potasio al 10% para poder visualizar las hifas y endosporas. El diagnóstico definitivo depende del cultivo e identificación de organismos mediante el uso de agar Sabouraud u otros medios de cultivo para dermatofitos.

Interferencia con la investigación:

No hay ejemplos conocidos de infecciones por dermatofitos que interfieran con las investigaciones en ratones y ratas.

Referencias

- Allen A M, Ganaway J R, Moore T D, Kinard R F. (1965); Tyzzer's disease syndrome in laboratory rabbits. *Am J Pathol*46:859–882.
- Amao H, Komukai Y, Sugiyama M, Takahashi K W, Sawada T, Saito M. (1995) Natural habitats of *Corynebacterium kutscheri* in subclinically infected ICGN and DBA/2 strains of mice. *Lab Anim Sci.*;45:6–10
- Amao H, Komukai Y, Akimoto T, Sugiyama M, Takahashi K W, Sawada T, Saito M. (1995); Natural and subclinical *Corynebacterium kutscheri* infection in rats. *Lab Anim Sci.* 45:11–14
- Arva E, Dahlgren U, Lock R, Andersson B. (1996) Antibody response in bronchoalveolar lavage and serum of rats after aerosol immunization of the airways with a well-adhering and a poorly adhering strain of *Streptococcus pneumoniae*. *Int Arch Allergy Immunol.* 109:35–43.
- Ayala M., Milocco S., Galosis C., Carbone C. (2010) Estudio de la enfermedad de Tyzzer (*Clostridium piliforme*) en diferentes cepas de ratas y ratones de laboratorio infectados experimentalmente. *Analecta Veterinaria Vol 30 (2)* pag 5-10
- Bailey C J, Lockhart B P, Redpath M B, Smith T P. (1995) The epidermolytic (exfoliative) toxins of *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol (Berlin).* 184:53–61.
- Baillie M B, Standiford T J, Laichalk L L, Coffey M J, Strieter R, Peters-Golden M. (1996) Leukotriene-deficient mice manifest enhanced lethality from *Klebsiella pneumoniae* in association with decreased alveolar macrophage phagocytic and bactericidal activities. *J Immunol.* 157:5221–5224.
- Ball-Goodrich L J, Johnson E. (1994) Molecular characterization of a newly recognized mouse parvovirus. *J Virol.*;68:6476–6486.
- Barthold S W, Beck D S, Smith A L. (1993) Enterotropic coronavirus (mouse hepatitis virus) in mice: influence of host age and strain on infection and disease. *Lab Anim Sci.* ;43: 276–284.
- Barthold S W, Coleman G L, Bhatt P N, Osbaldiston G W, Jonas A M. (1976) The etiology of transmissible murine colonic hyperplasia. *Lab Anim Sci.*. 26:889–894.
- Barthold S W, Coleman G L, Jacoby R O, Livstone E M, Jonas A M. (1978) Transmissible murine colonic hyperplasia. *Vet Pathol.*;15:223–236.
- Barthold S W, de Souza M S, Smith A L. (1990). Susceptibility of laboratory mice to intranasal and contact infection with coronaviruses of other species. *Lab Anim Sci.* 40:481–485.
- Barthold S W, Smith A L. (1992) Viremic dissemination of mouse hepatitis virus-JHM following intranasal inoculation of mice. *Arch Virol.* 122:35–44.
- Blailock Z R, Rabin E R, Melnick J L. 1967. Adenovirus endocarditis in mice. *Science.*;157:69–70.
- Boot R, Bisgaard M. (1995) Reclassification of 30 Pasteurellaceae strains isolated from rodents. *Lab Anim.*;29:314–319.
- Brogden K A, Cutlip R C, Lehmkuhl H D. (1993) Cilia-associated respiratory bacillus in wild rats in central Iowa. *J Wildl Dis.*;29:123–126.
- Carthew P, Sparrow S. (1980) A comparison in germ-free mice of the pathogenesis of Sendai virus and mouse pneumonia virus infection. *J Pathol.*;130:153–158.

- Cartner S C, Simecka J W, Briles D E, Cassell G H, Lindsey J R. (1996). Resistance to mycoplasmal lung disease in mice is a complex genetic trait. *Infect Immun.* 64:5326–5331.
- Cartner S C, Simecka J W, Lindsey J R, Cassell G H, Davis J K. (1995) Chronic respiratory mycoplasmosis in C3H/HeN and C57BL/6N mice: lesion severity and antibody response. *Infect Immun.* 63:4138–4142.
- Casebolt D B, Qian B, Stephensen C B. (1997) Detection of enterotropic mouse hepatitis virus fecal excretion by polymerase chain reaction. *Lab Anim Sci.* 47:6–10.
- Cassell G H. (1982) The pathogenic potential of mycoplasmas: *Mycoplasma pulmonis* as a model. *Rev Infect Dis.* 4: S18–S34.
- Clifford, C.B., Walton, B.J., Reed, T.H., Coyle, M.B., White, W.J. and Amyx, H.L. (1995). Hyperkeratosis in athymic nude mice caused by a Coryneform bacterium: microbiology, transmission, clinical signs and pathology. *Lab. Animal Sci.* 45 (2): 131-139.
- Connole M D. (1990) Review of animal mycoses in Australia. *Mycopathologia.* 111:133–164
- Cook I. (1963) Reovirus type 3 infection in laboratory mice. *Aust J Exp Biol Med Sci.* 41:651–660.
- Davis J K, Davidson M, Schoeb T R. (1991) Murine respiratory mycoplasmosis: a model to study effects of oxidants. *Res Rep Health Eff Inst.* 47:1–43
- Deeb B J, DiGiacomo R F, Bernard B L, Silbernagel S M. *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* infection in rabbits. *J Clin Microbiol.* 1990;28:70–75.
- Dick E J, Jr, Kittell C L, Meyer H, Farrar P L, Ropp S L, Esposito J J, Buller R M L, Neubauer H, Kang Y H, McKee A E. (1996) Mousepox outbreak in a laboratory mouse colony. *Lab Anim Sci.* 46:602
- Eiden J, Lederman H M, Vonderfecht S, Yolken R. (1986) T-cell-deficient mice display normal recovery from experimental rotavirus infection. *J Virol.*;57:706–708.
- Fallon M T, Benjamin W H, Jr, Schoeb T R, Briles D E. (1991) Mouse hepatitis virus strain UAB infection enhances resistance to *Salmonella typhimurium* in mice by inducing suppression of bacterial growth. *Infect Immun.* 59:852–856.
- FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) Working group on animal health (1994). Recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guineapig and rabbit breeding colonies, *Laboratory Animals* 28: 1-12.
- Fox, J.G. and Lee, A. (1997) The role of the *Helicobacter* species in newly recognised gastrointestinal tract diseases of animals. *Lab. Animal Sci.* 47 (3): 222-255.
- Ilback N G, Friman G, Crawford D J, Neufeld H A. (1991) Effects of training on metabolic responses and performance capacity in *Streptococcus pneumoniae* infected rats. *Med Sci Sports Exercise.* 123:422
- Livingston, R.S., Riley, L.K., Steffen, E.K., Besch-Williford, C.L. Hook, R.R. Jnr., Franklin, C.R. (1997). Serodiagnosis of *Helicobacter hepaticus* infection in mice by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 35 (5): 1236-1238
- National Reseach Council (NRC 1991). Infectious disease of mice and rats, National Academy Press Washington.

- Sheboul S, Crosley D, Steele T A. (1996) Inhibition of reovirus-stimulated murine natural killer cell cytotoxicity by cyclosporine. *Life Sci.* 59:1675–1682.
- Reetz, J.C., Wullenweber-Schmidt, M., Kraft V. and Hedrich. H.J. (1988), Rederivation of inbred strains of mice by means of embryo transfer, *Laboratory Animal Science* 38: 696-701.
- Rouleau A., Kovacs P., Kunz H., and Armstrong D. (1993) Decontamination of rat embryos and transfer to specific pathogen free recipients for the production of a breeding colony, *Laboratory Animals Science* 43: 611-615.
- Vitale N (1998) 12 th. Charles River Short Course. Embryo transfer technique in rodents Charles River Laboratories. Wilmington. USA
- White W., Anderson, L., Geistfeld J., and Martin D. (1998). Opportunistic infections in laboratory rats and mice. *ILAR Journal*,39:263-321.
- Zúñiga J. Orellana J. y Mari J. 2017. Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal. Gestión de recursos y capital humano en investigación experimental. Universidad de Alcalá. ISBN 10: 8416599939

CAPÍTULO 10

Control sanitario de los animales de laboratorio

Juan Martín Laborde

Control sanitario: objetivos, diseño, factores clave y muestras para el diagnóstico de enfermedades

El seguimiento de la salud de los animales de laboratorio es una parte esencial del proceso de investigación y ayuda a garantizar que los experimentos produzcan resultados confiables y precisos.

El control sanitario de las colonias consiste en un programa definido de test repetitivos y estandarizados, para evidenciar la presencia de determinadas infecciones y/o patógenos presentes en una colonia de animales y es el principal mecanismo para asegurar en forma continua, la calidad microbiológica de los mismos. Es de gran valor cuando se lo utiliza en colonias de animales que se mantienen bajo un sistema de barreras sanitarias donde puede aplicarse un riguroso control microbiológico y de esta forma, asegurar la eficiencia de los sistemas de barrera, las técnicas de manejo adoptadas, así como los informes sobre morbilidad y mortalidad que permiten la identificación anticipada de infecciones presentes y potenciales. Las investigaciones exhaustivas de enfermedades, muertes y resultados experimentales erróneos o inesperados, son componentes esenciales de este programa de salud en las colonias de animales. (Besselsen y col., 2008; Voipio y col., 2008; Fox y col., 2006; Reh binder y col., 2000; Nicklas y col., 2002; Nevalainen y col., 2000).

En primer lugar, se debe entender la razón por la cual se debe realizar un control de salud y también considerar que es fundamental diseñar un control sanitario en base a las necesidades de cada institución o bioterio.

En el caso de ser un bioterio de producción de animales de laboratorio es necesario certificar que la colonia está libre de patógenos y únicamente es posible hacerlo mediante un control sanitario; además de considerar que este requisito es muy importante para un centro productor de animales SPF.

También hay controles de salud diseñados para aquellos casos en los cuales se van a recibir animales provenientes de otras instituciones que ayudan a prevenir la introducción de patógenos en las colonias. En estos casos se recomienda realizarlos como parte de la cuarentena.

Se pueden diseñar programas para diagnosticar la causa de enfermedades y eliminar rebrotes de infecciones en la colonia. Como también para ayudar a interpretar resultados dudosos o

confusos de ensayos, donde se sospecha que las variables experimentales podrían deberse a la presencia de microorganismos en los animales y este control de salud podría ser la respuesta al problema.

El objetivo es implementar un programa de control sanitario que sea adecuado, que permita obtener resultados útiles y no sea demasiado costoso. En muchos casos el costo es el factor determinante frente al presupuesto con que cuenta el bioterio. Obviamente, este es muy significativo, pero también debemos considerar la importancia que tiene el poder contar con un programa de salud que apoye a los investigadores, la investigación y a las experiencias que se realizan de las que se espera la obtención de resultados confiables (Prichett-Corning y col., 2009; Hayashimoto y col., 2013; Mähler y col., 2013).

Es así que en un programa de control sanitario es importante considerar los siguientes factores: el costo, la experiencia que se va a realizar, el tipo de bioterio y los animales que se van a utilizar. También en las decisiones que se deben tomar al momento de diseñar un programa de salud adecuado, hay que considerar los siguientes aspectos: los patógenos que se van a incluir en el diagnóstico, la frecuencia con que se va a realizar el control, si se van a utilizar o no animales centinela, la elección del laboratorio que va a realizar este control y el tipo de muestra a enviar. Para el envío de muestras existen muchas variantes. El envío de animales vivos, ya sean centinelas o de la colonia, permite realizar un control sanitario completo, ya que durante la necropsia es posible detectar lesiones macroscópicas en el animal, tomar muestras para estudios histopatológicos y para otras técnicas; inclusive brinda la posibilidad de detectar la presencia de algunos parásitos mediante la observación directa de muestras al microscopio. También existe la posibilidad de remitir muestras de suero para realizar técnicas serológicas, en particular para control de virus.

Las técnicas moleculares, como la PCR, ofrecen una sensibilidad y especificidad diagnóstica excelente, como también la posibilidad de procesar una gran variedad de muestras para detectar numerosos patógenos, sumado a que el envío de las mismas es simple.

Las muestras para bacteriología y parasitología en general consisten en heces y raspado de piel o muestras de pelo, aunque el envío de animales vivos, permite un diagnóstico más efectivo, dando la posibilidad de extraer otro tipo de material durante la necropsia como hisopados, exudados o parte de órganos para detectar diferentes patógenos.

Asimismo, es posible realizar controles sin el envío de animales y en su lugar remitir muestras de los mismos, ya sea suero de animales centinela, o un pool de heces, frotis de piel, escaras y en algunos casos órganos de animales centinela o de aquellos a los que se les realizó la eutanasia durante una experiencia. En este caso las muestras se guardan a -20°C o a -80°C , según el tipo de virus a diagnosticar (ADN o ARN) y la posibilidad de contar con freezers de estas características, hasta el momento de enviarlas. En la actualidad, un procedimiento simple y eficiente para realizar el diagnóstico, es mediante el envío de una gota de sangre de cada animal en un material semejante al papel, que provee el mismo laboratorio que hace este tipo de diagnóstico, el costo dependerá del valor del envío y del número de patógenos que se solicite diagnosticar. Una gran ventaja es que no es ne-

cesario el sacrificio del animal para tomar la muestra, aclarando que con una sola gota se logran diagnosticar un panel de patógenos casi completo.

Un aspecto que también influye en el diseño del programa de salud está en relación a los tipos de instalaciones y a la forma de alojamiento de los animales a controlar. Los bioterios pueden tener salas con estantes y cajas o jaulas para alojar los animales, o contar con equipamiento más moderno como son los racks ventilados. En aquellos bioterios que tienen estantes tradicionales y mantienen animales libres de patógenos específicos, se debe contar con aire filtrado a través de filtros de alta eficiencia (HEPA) que retienen más del 99 % de las partículas del aire de la sala donde se alojan. Además, es necesario que haya presión positiva en las salas de animales. También existen bioterios con estanterías o racks ventilados, en los cuales cada una de las cajas cuenta con un aislamiento completo, ventilación individual y fundamentalmente el aire de entrada y de salida con filtración absoluta, lo cual impide la transmisión de patógenos entre animales en caso de existir una contaminación en la colonia. En instalaciones que producen animales SPF es un requisito indispensable tener un programa de control sanitario y el mismo debe realizarse cada 3 meses según las recomendaciones internacionales. En el caso de bioterios de cría con producción de animales convencionales, se recomienda también la implementación de un programa de salud que no contemple únicamente las zoonosis, sino un número mayor de agentes patógenos, aunque el mismo se realice una o dos veces al año. Los bioterios experimentales por lo general trabajan con animales que poseen un certificado de salud y las experiencias son cortas, habitualmente uno o dos meses. En este caso, y según el tipo de experiencia a realizar, también debemos considerar si se deben incluir otros patógenos que no estaban en el certificado de salud. Además, hay bioterios que disponen de un sistema de aisladores para alojar los animales, especialmente en aquellos donde se producen y/o mantienen animales libres de gérmenes o *germ free*, en este caso se recomienda realizar un control sanitario cada 15 días. Estos aisladores se utilizan principalmente para experimentación ya que reducen al mínimo el contacto entre los animales y las personas que trabajan con los mismos.

Otros bioterios poseen salas de cuarentena para los animales que ingresan provenientes de otras instituciones esto también va a condicionar el diseño del programa de control de salud que se implemente, por ejemplo, algunos países tienen reglamentaciones estrictas de control sanitario sobre los animales que ingresan al país durante esa cuarentena (Howard y col., 2004; Fox y col., 2006).

Para determinar el número de animales necesarios para un control sanitario se utilizan tablas estadísticas que permiten relacionar la prevalencia conocida de una enfermedad con un 95% o 99% de certeza para poder detectar un patógeno determinado. En líneas generales a mayor prevalencia menor será el número de animales necesarios para detectarlo en un control de salud. El número mínimo que se recomienda utilizar si se quiere conocer el estado sanitario de una colonia de más de 100 animales, es entre 8 y 10 animales por sala, o 6 por cada rack ventilado o aislador considerados cada uno como una unidad microbiológica. La determinación de este número se verá influenciado también por la cantidad total de animales presentes en las salas, los racks o el aislador. Los animales de esta muestra deben ser mitad machos y mitad

hembras y en cuanto a la edad: 4 animales adultos, 4 jóvenes y 2 de destete, tomados al azar y de diferentes alturas de las estanterías o racks.

En algunos casos, como en el rack ventilado o en un aislador, donde los animales alojados son de mucho valor y escaso número, es recomendable utilizar animales centinela para realizar el control. Los animales centinela son aquellos cuyo estatus sanitario se conoce y que mediante un manejo adecuado remplazarán a los animales de la colonia en el control sanitario. En el caso de usar animales centinela inmunodeficientes aumenta significativamente la posibilidad de obtener mejores resultados en la detección de patógenos si se controlan mediante las técnicas de PCR y bacteriología; pero para realizar técnicas serológicas entonces se realizan en animales inmunocompetentes.

Existen tres variantes en el uso de los centinelas. Uno es mediante la incorporación en la caja de estos animales de una porción de lecho o cama sucia, proveniente de los animales de la colonia. Lo más práctico, es colocar por semana, lecho sucio de cajas que se encuentren a distintas alturas del rack, por ejemplo, la primera semana de los estantes superiores, la semana siguiente de los estantes del medio y por último de los estantes inferiores. Y repetir este esquema hasta el momento del control sanitario. La otra variante, es la de centinelas convivientes con los animales en el mismo microambiente, en este caso se los va rotando semanalmente en las diferentes cajas. Esta metodología permite aumentar las posibilidades de que los centinelas tomen contacto con el patógeno presente y se infecten, pero la desventaja es que los animales convivientes deben ser del mismo sexo y de diferente color de pelaje para no confundirlos. Por último, tenemos la caja o jaula colectora de aire de salida del rack ventilado, en donde se colocan los centinelas. En este caso se tiene mayor posibilidad de detectar patógenos respiratorios.

En muchos bioterios se ha implementado el control sanitario mediante la utilización de animales centinela, ya que permite una reducción en el envío de muestras, y evita el sacrificio de animales valiosos de la colonia. Como regla general se utilizan 3 centinelas inmunodeficientes y 3 inmunocompetentes por rack o estantería, divididos en 3 cajas con 2 animales cada una, las que se colocan a diferentes alturas. En los inmunocompetentes se pueden utilizar todas las técnicas de diagnóstico mencionadas; pero en los animales inmunodeficientes no pueden realizarse técnicas serológicas porque no generan anticuerpos. Cualquiera sea la variante en la utilización de centinelas es importante que los que están en la misma caja sean del mismo sexo para evitar la reproducción. El control sanitario de estos animales se realiza cada 3 o 6 meses dependiendo de la condición microbiológica de la colonia. Dentro de los beneficios de utilizar centinelas está el hecho de que es la única manera de poder realizar serología en una colonia de animales inmunodeficientes, haciéndolo más ventajoso aun para los controles por PCR, parasitología o bacteriología. Otra ventaja muy importante es que un animal centinela puede utilizarse para varias cajas y en consecuencia disminuye el costo del control sanitario (Nicklas y col., 2010; Compton y Riley, 2001; Hayashimoto y col., 2013; Besselsen y col., 2008; Voipio y col., 2008; Fox y col., 2006; Reh binder y col., 2000).

Métodos de diagnóstico para bacterias y hongos

El cultivo microbiológico se utiliza para la detección de bacterias y hongos en los animales. Las diferentes muestras de piel, tracto respiratorio y tracto digestivo, como lesiones o patologías observadas en los animales durante la necropsia se cultivan en caldo o placas con agar. Mediante la observación del crecimiento, el tipo de colonias y siguiendo los diferentes criterios de diagnóstico a través de las pruebas bioquímicas para la identificación específicas de cada patógeno determina la presencia de bacterias u hongos. Algunas pueden diagnosticarse simplemente por las características de la colonia, morfología, color y olor; como por ejemplo *Pseudomonas aeruginosa* cuya colonia en un medio selectivo es de color verde y con olor característico. El origen de la muestra y las propiedades de las bacterias que se controlan determinan el tipo de medio de cultivo se utilizará (selectivos o diferenciales) y las condiciones de incubación (aeróbico o anaeróbico). El cultivo microbiológico y la identificación de las bacterias y hongos requiere de equipos y sobre todo de una vasta experiencia por parte de la persona que lo realiza. (Fox y col., 2006; Percy y Barthold, 2007).

Métodos de diagnóstico serológicos

Se fundamentan en la investigación de anticuerpos séricos formados por la activación del sistema inmunológico de los animales que entraron en contacto con un antígeno. Existen varios métodos donde la sensibilidad y especificidad varía mucho entre ellos. Lo ideal es utilizar métodos sensibles, específicos y rápidos, de forma tal que los resultados que se obtengan sean confiables y de bajo costo.

La serología es uno de los principales métodos de laboratorio utilizados para controlar las infecciones virales en colonias de ratones. Asimismo, varios agentes infecciosos de ratones no virales pueden detectarse mediante serología porque estos agentes infecciosos también provocan de forma fiable una respuesta de anticuerpos en ratones inmunocompetentes (*Bordetella bronchiseptica*, *Corynebacterium kutscheri*, *Mycoplasma pulmonis*, *Filobacterium rodentium* o *CAR Bacillus*, *Clostridium piliforme* y *Encephalitozoon cuniculi*). Los beneficios de las pruebas serológicas son su bajo costo y proporcionar información sobre infecciones crónicas que ocurren en una colonia de animales, porque los anticuerpos séricos generalmente persisten durante meses después de la infección. Además, las técnicas serológicas actuales, como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y el inmunoensayo fluorométrico multiplexado (MFI, Luminex) permiten la detección de múltiples agentes infecciosos a partir de una sola muestra de suero. Ambas técnicas de control también se pueden utilizar como pruebas de alto rendimiento y son los sistemas de diagnóstico de enfermedades más rentables para la vigilancia a gran escala. Otra prueba de serología, es el ensayo de anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta (IFI), se utiliza a menudo para confirmar resultados equívocos de ELISA o MFI debido a su alta sensibilidad y especificidad. Sin embargo, la realización de IFI requiere en gran

medida de la experiencia técnica del observador, por lo que no se utiliza con tanta frecuencia como las otras dos.

Los laboratorios de control sanitario proporcionan al usuario información sobre cómo preparar muestras de sangre para las pruebas serológicas, como proporcionar formularios para el envío y conservación de muestras en general (Liang y col., 2009; Carty, 2008; Liang y col., 2009; McInnes y col., 2011; Prichett-Corning y col., 2009).

Métodos de diagnóstico molecular:

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida por la sigla PCR, (del inglés: *Polymerase Chain Reaction*), es la técnica molecular más utilizada en laboratorios de diagnóstico de animales de experimentación, para la detección de agentes patógenos (virus ADN, bacterias, parásitos) y mediante transcripción inversa (RT) -PCR para virus ARN. Estos ensayos detectan una región específica de ácido nucleico genómico (ADN o ARN) del agente infeccioso y pueden usarse también durante una infección activa. La confirmación de resultados positivos en PCR se determinan por: la secuenciación directa de fragmentos de ADN amplificados; un ensayo de PCR alternativo con el mismo ADN / ARN o el mismo ensayo de PCR con diferentes muestras. Esta técnica se utiliza cada vez más como parte de los programas de control sanitario en animales de experimentación debido a sus importantes ventajas sobre la serología o el cultivo microbiológico. La PCR también es valiosa como prueba ante mortem no invasiva, ha demostrado ser práctica y útil para la detección de ciertos agentes infecciosos en muestras fecales, lecho de cajas o diferentes muestras de racks ventilados.

La principal limitación de esta técnica como herramienta de diagnóstico es que, para la mayoría de los agentes, solo puede detectar infecciones activas. Por lo tanto, la PCR se utiliza mejor en el control sanitario de rutina para detectar la presencia de infecciones recientes o activas en las muestras que se envían regularmente a un laboratorio de diagnóstico de una colonia. Sin embargo, esta técnica es especialmente eficaz para detectar infecciones en animales inmunodeficientes y transgénicos ya que las infecciones a menudo persisten en ellos y aumenta la probabilidad de hallar el patógeno. Dado que la PCR se utiliza para un agente infeccioso específico, la selección de la muestra a enviar requiere que la persona que lo va a realizar conozca la patogenia de ese agente, su tropismo tisular y la duración de la infección; así podrá decidir cuál es la muestra más apropiada. Otra limitación es su dependencia del manejo adecuado de la muestra durante la recolección y el procesamiento, aspecto clave para evitar la contaminación cruzada o la degradación de la muestra, lo que puede llevar a resultados incorrectos ya sean falsos positivos o falsos negativos (Compton y Riley, 2001; Carty, 2008; Prichett-Corning y col., 2009).

Métodos de diagnóstico parasitológicos

El examen microscópico directo de muestras frescas se utiliza con frecuencia como método de detección principal para la identificación de endo y ectoparásitos. Endoparásitos como especies de *Trichomonas* o *Giardia* se pueden identificar en muestras de ciego y de duodeno con solución salina sobre un portaobjeto observadas en un microscopio óptico y de la misma manera para otros parásitos protozoarios. La identificación de adultos y huevos de nematodos intestinales también se puede realizar microscópicamente. Para mejorar este proceso, los huevos se pueden concentrar mediante las técnicas de sedimentación y de flotación, en donde las muestras de contenido intestinal de acuerdo con la solución en que se las mezcle y considerando las densidades específicas permiten que los huevos “floten” o “sedimenten” luego de una centrifugación; para luego observarlos en el microscopio óptico. Los ectoparásitos, como los ácaros de piel, también se identifican mediante la evaluación microscópica de muestras de piel o directamente de pelo de los animales de la cabeza, cuello, axilas, ingle y dorso. En todos los casos, se requiere experiencia en la identificación microscópica de parásitos para confirmar de manera confiable su presencia.

Actualmente las técnicas moleculares como la PCR también se usan para el diagnóstico de parásitos (Fox y col., 2006; Percy y Barthold, 2007).

Control sanitario de cepas inmunodeficientes y transgénicas

Las cepas inmunodeficientes y muchas de las que son genéticamente modificadas, también llamadas transgénicas, tienen una mayor susceptibilidad a los agentes infecciosos que las inmunocompetentes, y esto debe considerarse en los controles cuyo objetivo es detectar agentes infecciosos. Por ejemplo, *Pneumocystis murina* es un patógeno oportunista que en ratones inmunocompetentes no produce infección clínica, sin embargo, en muchas cepas de ratones inmunodeficientes esta especie produce infecciones pulmonares letales. Muchos animales genéticamente modificados son “inmunovariantes” es decir, tienen una capacidad desconocida o variable para dar una respuesta inmune eficaz, por lo cual estas cepas deben considerarse potencialmente susceptibles a las infecciones con este agente. Actualmente, el mejor método para identificar especies de *Pneumocystis* en ratones es mediante la técnica de PCR en una muestra de tejido pulmonar. Esto requiere que la muestra de pulmón se tome y envíe correctamente al laboratorio. En los controles sanitarios de colonias de animales inmunodeficientes, o centinelas inmunodeficientes, debería considerarse el diagnóstico de este patógeno. Se puede observar abscesos, otitis u otros signos clínicos que no se producen en el animal inmunocompetente. Bacterias como *Helicobacter spp.*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, así como algunas especies de *Staphylococcus coagulans* negativas o *Pasteurella pneumotropica* y *Corynebacterium bovis* se encuentran entre los oportunistas más comúnmente identificados en estos animales. La forma de contagio más frecuente con estas bac-

terias es a través del medio ambiente, el personal técnico e investigadores, fómites contaminados con estos microorganismos, por ejemplo, alimento, jaulas, cajas y el lecho.

Los agentes virales suelen causar una infección aguda en ratones inmunocompetentes sin signología clínica seguida de una recuperación completa. Por el contrario, en ratones inmunodeficientes pueden ser asintomáticas, pero persistentes, convirtiéndose en portadores crónicos del virus y actuando como fuente de infección para otras colonias, especialmente si ese virus se elimina por heces (Weisbroth, 2006; Treuting y col., 2012).

Todas estas pruebas de diagnóstico mencionadas: bacteriológicas, serológicas, parasitológicas y moleculares nos pueden brindar resultados precisos para la identificación de una enfermedad infecciosa que está presente en una colonia de animales; sin embargo, se debe tener en cuenta que ante resultados dudosos es recomendable utilizar técnicas complementarias. En verdad, no existe una técnica infalible ni una regla de oro para seguir y llegar a obtener resultados precisos en el diagnóstico de microorganismos en colonias de animales de experimentación, lo aconsejable es saber que solo mediante la realización del conjunto de técnicas se puede lograr un resultado confiable.

Referencias

- Besselsen D, Franklin C, Livingston R, and Riley L. 2008. Lurking in the shadows: Emerging rodent infectious diseases. *ILAR J.* 49: 277- 290. doi: 10.1093/ilar.49.3.277
- Carty A. 2008. Opportunistic infections in mice and rats: Jacoby and Lindsey revisited. *ILAR J.* 49: 272- 276. doi: 10.1093/ilar.49.3.272
- Compton S, and Riley L. 2001. Detection of infectious agents in laboratory rodents: Traditional and molecular techniques. *Comp. Med.* 51: 113- 119.
- Fox J, Barthold S, Newcomer C, Smith A, and Quimby F. 2006. *The Mouse in Biomedical Research: Diseases*, 2nd edition, Vol. 2. Academic Press, New York.
- Hayashimoto N, Morita H, Ishida T, Yasuda M, Kameda S, Uchida R, Tanaka M, Ozawa M, Sato A, Takakura A, Itoh T, and Kagiya N. 2013. Current microbiological status of mice and rats in experimental facilities in Japan. *Exp. Anim.* 62: 41- 48. doi: 10.1538/expanim.62.41
- Homberger F, Boot R, Feinstein R, Kornerup-Hansen A, & van der Logt J. FELASA guidance paper for the accreditation of laboratory animal diagnostic laboratories. *Lab. Anim.* 33, S1:19–S1:38 (1999).
- Howard B, van Herck H, Guillen J, Bacon B, Joffe R, Ritskes-Hoitingal M. Report of the FELASA Working Group on evaluation of quality systems for animal units. *Lab. Anim.* 38, 103–118 (2004).
- Liang C, Shih A, Chang Y, Liu C, Lee Y, Hsieh W, Huang Y, Huang W, Kuang C, Lee K, Zhuo Y, Ho S, Liao S, Chiu Y, Hsu C, Liang S, and Yu C. 2009. Microbial contaminations

- of laboratory mice and rats in Taiwan from 2004 to 2007. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 48: 381- 386.
- Mähler M, Berard M, Feinstein R, Gallagher A, Illgen-Wilcke B, Pritchett-Corning K, and Raspaet M. 2014. FELASA recommendations for the HM of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit, colonies in breeding and experimental units. *Lab. Anim.* 48: 178- 192. doi: 10.1177/0023677213516312
- McInnes E, Rasmussen L, Fung P, Auld A, Alvarez L, Lawrence D, Quinn M, del Fierro G, Vassallo B, and Stevenson R. 2011. Prevalence of viral, bacterial and parasitological diseases in rats and mice used in research environments in Australasia over a 5-y period. *Lab. Anim.* 40: 341- 350. doi: 10.1038/labani1111-341
- Nevalainen T, Dontas I, Forslid A, Howard B, Klusa V, Kasermann P, Melloni E, Nebendahl K, Stafleu F, Vergara P & Verstegen J. FELASA recommendations for the education of persons carrying out animal experiments (Category B). *Lab. Anim.* 34, 229–235 (2000).
- Nicklas W, Baneaux P, Boot R, Decelle T, Deeny A, Fumanelli M, Illgen-Wilcke B. (2002) (FELASA) Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group on Health Monitoring of Rodent and Rabbit Colonies. Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units *Laboratory Animals* 36,20-42(10).
- Nicklas W, Deeny A, Diercks P. et al. FELASA guidelines for the accreditation of health monitoring programs and testing laboratories involved in health monitoring. *Lab Anim* 39, 43–48 (2010). <https://doi.org/10.1038/labani0210-43>
- Percy D, and Barthold S. 2007. *Pathology of Laboratory Rodents and Rabbits*, 3rd edition. Blackwell Publishing, Ames, Iowa.
- Pritchett-Corning K, Cosentino J, and Clifford C. 2009. Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice and rats. *Lab. Anim.* 43: 165- 173. doi: 10.1258/la.2008.008009
- Rehbinder C, et al. FELASA recommendations for the health monitoring of experimental units of calves, sheep and goats. *Lab. Anim.* 34, 329–350 (2000).
- Treuting P, Clifford C, Sellers R, and Brayton C. 2012. Of mice and microflora: Considerations for genetically engineered mice. *Vet. Pathol.* 49:44-63. doi: 10.1177/0300985811431446
- Voipio^a, Baneux P, Gomez de Segura IA, Hau J, Wolfensohn S. (2008). Guidelines for the veterinary care of laboratory animals: report of the FELASA/ECLAM/ESLAV Joint Working Group on Veterinary Care. *Laboratory Animals* 42,1-11 (10).
- Weisbroth S. 2006. Pneumocystis: New knowledge about the biology of this group of organisms in laboratory rats and mice. *Lab. Anim.* 35:55-61. doi: 10.1038/labani1006-55

CAPÍTULO 11

El ratón como animal de experimentación

Miguel Ángel Ayala

El ratón es el animal más utilizado en las pruebas de diagnóstico e investigación. Conjuntamente con el pez y la rata alcanzan al 90 % de todos los animales usados con fines científicos. La disponibilidad comercial, su pequeño tamaño, vida relativamente corta, su alta tasa reproductiva, su bajo costo de mantenimiento y la adaptación a la explotación en grandes colonias, permitieron que sea una de las especies de laboratorio más estudiadas. El conocimiento completo de su genoma, su anatomía, su fisiología, su amplia variabilidad genética, la aparición de enfermedades espontáneas, la susceptibilidad a agentes químicos y microbianos, han permitido desarrollar modelos animales de enfermedades similares a las desarrolladas en el humano y en otras especies animales.

De todas estas características hay tres que debemos resaltar:

- Debido a que soportan bien la consanguinidad, es posible obtener cepas que son virtualmente homocigotas para todos sus loci por medio de la endocria.
- Es posible criar híbridos viables y fértiles por cruzamientos de cepas de laboratorio con varias especies derivadas de animales salvajes.
- Se ha conseguido realizar las técnicas de transgénesis que producen alteraciones heredables del genoma casi a pedido.

Origen

El ratón doméstico (*Mus musculus*) pertenece al orden de los roedores que con casi sus 2000 especies constituye el orden de mamíferos más numeroso. A su vez pertenece al suborden de los miomorfos, que tiene el de mayor número de especies dentro del orden. La palabra *Mus* proviene del griego, del latín y del sanscrito, y en todos significa: *robar*.

En la naturaleza existe un grupo de especies que aún siguen sin diferenciarse y que pueden hibridarse, por eso se las clasifica como subespecies. Actualmente existen cuatro:

- *Mus musculus domesticus* distribuido en Europa oriental, Africa, Arabia y Medio Oriente y transportada por el hombre a América.
- *Mus musculus musculus* distribuido por Europa oriental, Japón, China y Rusia.
- *Mus musculus castaneus* distribuido por Ceilán y Sudeste Asiático.
- *Mus musculus bactrianus* distribuido por Pakistán, Irán y la India.

El origen se sitúa en el Sudeste Asiático (India), donde se encontró un fósil de 7 millones de años. Unos 6000 años a.C. ya se encontraban en Turquía y posteriormente se difundieron por Europa con las invasiones romanas. Llegan a América a fines del siglo XV con la conquista (Benavidez 2003).

Origen de las cepas de ratones de laboratorio

El establecimiento de líneas de ratones estandarizados o caracterizados, se debe mucho a su existencia previa como tradición de cría y venta como mascotas. En siglo XVIII y XIX criadores asiáticos y europeos comenzaban a seleccionar y desarrollar una variedad de mutantes.

La cría de ratones por los biólogos condujo a una amplia variabilidad genética, lo que despertó el interés para emplearlo como animal de laboratorio, hecho que iniciaron los científicos a fines del siglo XIX.

Todas las cepas o stocks de ratones de laboratorio existentes derivan de cruces entre ratones salvajes y de criaderos. Estudios sobre el cromosoma revelan que la mayoría de las cepas de laboratorio están formadas por un mosaico de dos subespecies; *mus musculus musculus* y *mus musculus domesticus* por lo que las cepas clásicas de laboratorio pueden considerarse recombinantes inter subespecíficas no existentes en la naturaleza y a las cuales podrían referirse como *Mus "laboratorius"*.

La primera línea obtenida genéticamente homogénea (consanguínea) de ratones fue la DBA, realizada por Little en la Universidad de Harvard, en 1909. Luego en 1918 Little se muda al Cold Spring Harbor Laboratory y ahí se desarrollan las líneas C57BL/6, C57BL/10, C3H, CBA y la BALB/c (Benavidez 2003).

Taxonomía

Clase:	Mamífero
Orden:	Rodentia
Suborden:	Myomorpha
Familia:	Muridae
Género:	<i>Mus</i>
Especie:	<i>musculus</i>

Biología general

El ratón doméstico es una especie cosmopolita, comensal del hombre, que se adapta ampliamente a una gran variedad de condiciones ambientales y climáticas, desde zonas muy frías

hasta regiones tropicales. En general la especie prefiere lugares más secos que húmedos; son de hábitos nocturnos. Posee un agudo sentido de la audición, y responde a un amplio rango de secuencias ultrasónicas, por ejemplo, cuando las crías salen del nido, emiten sonidos ultrasónicos que inmediatamente son percibidos por la madre. En el laboratorio los ratones se alteran por sonidos de muy baja frecuencia, por lo que hay que tener cuidado con los equipos que se utilizan dentro del mismo o en sus cercanías (Green E. 1975).

El sentido del olfato está muy desarrollado, no sólo para detectar el alimento y depredadores, sino también para percibir un orden social, se sabe que olores extraños por ejemplo asociados con los humanos pueden producir respuestas por estrés (Dhanjal 1991).

La visión es muy pobre, la retina tiene muy pocos conos, y por lo tanto no pueden percibir los colores; solo perciben muy poco el color rojo; es por esto que los ratones dependen más de las marcas por olor, emisiones audibles o ultrasónicas y estímulos táctiles, que de la visión.

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

Generalmente son muy dóciles a excepción de algunos stocks exocriados 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 la temperatura corporal del animal y modificar su fisiología.

El tamaño del ratón adulto varía entre 12 a 15 cm. desde la punta de la nariz a la punta de la cola. El largo de la cola es igual al largo del cuerpo. El recién nacido pesa entre 1 a 2 gr. y gana rápidamente peso durante la lactancia. El tamaño del cuerpo del adulto varía de acuerdo a variables intrínsecas: genotipo, sexo y edad y a variables extrínsecas: dieta, número de ratones por caja y temperatura ambiental (Green E. 1975).

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.

En general, los ratones híbridos, producto del cruzamiento entre dos cepas puras, viven más que los parentales. Las cepas de ratones genéticamente modificados generalmente tienen corta vida solo algunos meses; mientras que otras cepas longevas viven entre 24-30 y hasta 36 meses. (Benavidez 2003).

Comportamiento

El ratón de laboratorio es un animal sociable y, usualmente, se mantiene en grupos sin ningún inconveniente. Estos grupos deben formarse rápidamente luego del destete; sin embargo, los machos de ciertas cepas como por ejemplo HRS/J, BALB/cJ, SJL/J, comienzan a mostrar su agresividad entre la séptima y décima semana de edad, aun cuando estos grupos se hayan

establecido al destete. Las hembras generalmente no pelean, incluso cuando se hayan agrupado siendo ya adultas. (Fox J. 2006)

No hay razón científica que demuestre que los ratones no pueden sufrir dolor, angustia o sufrimiento como otros vertebrados; de hecho, su sistema nervioso central y periférico comparte características anatómicas y funcionales con el humano (Resasco A. 2018)

El ratón normalmente divide su caja en áreas específicas para dormir, comer, orinar y defecar. Los ratones de laboratorio muy 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. Tienen preferencia por los cereales, como por ejemplo trigo, arroz, cebada, etc., y toman agua también durante las horas de oscuridad. La cantidad del agua consumida varía considerablemente entre las diferentes cepas endocriadas, y algunas como por ejemplo MA/MyJ, STR, y SWR/J pueden desarrollar polidipsia.

Las hembras parturientas construyen un nido y permanecen mucho tiempo cerca del mismo o sobre las crías. Tanto la hembra como el macho, limpian a los neonatos y evitan que otras crías se acerquen al nido (Resasco 2018). El canibalismo de los ratones jóvenes puede ser un serio problema en colonias endocriadas. La manipulación de los recién nacidos debe hacerse de manera suave y tranquila, y devolver la camada al nido lo más pronto posible.

Usos en el laboratorio

El ratón es el animal más utilizado en el laboratorio por su pequeño tamaño, su fácil manejo y su bajo costo de mantenimiento comparado con especies de mayor tamaño (Fox J. 2007)

Debido a su vida relativamente corta, son excelentes para su uso en ensayos crónicos de toxicología, microbiología, virología, gerontología, oncología, parasitología, farmacología, inmunología, embriología, teratología, en estudios genéticos, etc. Por compartir tantas características anatómicas y funcionales con el sistema nervioso humano se los utiliza como modelo en ensayos de analgésicos, antidepresivos y ansiolíticos (Fox J., 2006)

Existen diversas líneas de ratones mutantes naturales e inducidos por diversas técnicas, que reproducen modelos de diferentes enfermedades, similares a las ocurridas en el hombre y otras especies animales; entre algunas de ellas podemos nombrar: diabetes, hipertensión, cáncer, desórdenes de la visión, enfermedades autoinmunes, desórdenes de la audición, enfermedades de huesos y cartílagos, desórdenes neurológicos, inmunodeficiencias, arteriosclerosis, etc. (Benavidez F., 2003)

Macroambiente

Temperatura

La temperatura de las habitaciones debe mantenerse entre los 18°C y los 25 C°, siendo la más adecuada entre los 22 C°+/- 2 y la humedad relativa entre 40 y 70%, cuando la humedad es inferior a estos parámetros se produce el síndrome de la cola anillada o ring tail (Fox J 2006).

Ventilación

La ventilación es importante para controlar la humedad, el calor, y los gases tóxicos. Se deben hacer entre 10 y 14 recambios del volumen total del aire de la sala por hora. Lo que se debe lograr es una correcta entrada y salida de aire, y esto es posible colocándolas de forma que ambas queden enfrentadas (Zúñiga 2015).

Iluminación

La iluminación es importante para la regulación del ciclo estral y reproductivo. Se recomienda una intensidad de 40 lux a la altura de las cajas y brindar 12 hs luz/12 hs oscuridad. En ceapas albinas si la iluminación es muy intensa se puede observar fototoxicidad (Zúñiga 2015).

Ruidos

Los ratones son muy sensibles a los ruidos, por lo que estos deben evitarse cuando se trabaja con ellos.

Olores

Son muy sensibles a los olores ya que irritan las vías respiratorias. Debe evitarse utilizar desinfectantes con perfume.

Microambiente

Cajas

Los ratones que se utilizan con propósitos experimentales se alojan en cajas metálicas, o de plástico transparente policarbonato o polipropileno que son más livianas provistas de tapas enrejadas de acero inoxidable. Estas cajas se colocan en estanterías comunes, generalmente de metal y con ruedas para facilitar la limpieza y el manejo de las mismas. También existen cabinas aisladoras para colocar las cajas y racks ventilados. En otros países existen laboratorios en donde el lugar del lavadero no es muy amplio como para poder lavar y desinfectar todo el material, por lo que se utilizan cajas descartables.

Densidad animal

En el caso de los ratones adultos (con un peso aproximado de 30 gr.) se requiere una superficie mínima de 97 cm² por animal, superficie que debe aumentarse hasta 390 cm² en el caso de las hembras lactantes con su camada. En todos los casos la altura de las paredes de la caja no debe ser inferior a 15 cm y en cajas de tamaño estándar en cuanto a la densidad animal, se aconseja colocar de 3 a 5 ratones

Camas

Las camas deben estar libres de polvillo, deben ser absorbentes, atóxicas, no producir alergias y deben ser esterilizables. En este sentido, cabe señalar como las más adecuadas la viruta blanca de álamo, la roja no se aconseja ya que puede teñir al animal y provocar alteraciones en la relación entre ellos, además de activar algunas enzimas hepáticas pudiendo alterar los resultados de los ensayos. (Resasco A. 2018). El pino no se aconseja por tener mucha resina. También se puede utilizar papel de celulosa, o marlo de maíz pero teniendo en cuenta que con él no pueden construir el nido por lo que debemos proporcionarle material para que lo hagan, como algodón, papel, cartón, Se recomienda la limpieza y desinfección de las cajas una vez por semana, dependiendo de la cepa y de la ventilación del ambiente, por ejemplo la cepa CF1, de mayor tamaño, debe cambiarse dos veces por semana, mientras que la BALB/c de tamaño menor puede cambiarse solo una vez por semana. El lecho debe mantenerse seco, pero teniendo en cuenta que la limpieza excesiva perturba las marcas olorosas y estresa al animal (Resasco A. 2018, Zúñiga 2015).

Agua

El agua debe administrarse *ad-libitum*, en mamaderas o en bebederos automáticos. Agua potable la que se puede clorinar, para evitar contaminaciones. También puede esterilizarse por medio de autoclave o por filtración.

Alimento

El alimento se administra *ad-libitum*, generalmente son preparados comerciales en forma de pellets o extrusado. Debe ser de buena calidad, económico, lo suficientemente duro como para que el animal pueda roer y desgastar sus dientes, y lo suficientemente blando como para que las crías puedan comerlo. Para los animales S.P.F., axénicos y gnotobióticos el alimento debe ser estéril. La esterilización se puede hacer por medio de radiación o autoclave, en este último caso el alimento debe reforzarse por perder nutrientes durante el proceso.

Un ratón adulto diariamente consume aproximadamente 12 gr. de alimento por cada 100 gr. de peso corporal, pero al igual que el agua consumida varía en función de la temperatura ambiente y humedad relativa, sequedad y calidad del alimento, estado reproductivo y sanitario, etc. (Zúñiga 2015).

Programa reproductivo

El programa reproductivo debe establecerse teniendo en cuenta una serie de premisas, básicamente: espacio e insumos disponibles, fecundidad de la cepa a emplear y esquema de consanguinidad. La ratona es poliéstrica continua. Tras el parto, a las 14 - 28 hs se produce un celo fértil, de manera que, si las necesidades productivas lo exigen, pueden cubrirse. Hay que tener en cuenta que la lactación y gestación simultáneas puede retrasar entre 3 y 5 días la implantación de los embriones.

Al nacer, el ratón de laboratorio pesa un gramo, nacen con los ojos y oídos cerrados, sin pelos, y muy activos. Al tercer día comienza a notárseles el pelo y está completamente cubierto a los 10 días. A los 12 días comienzan a abrir los ojos y el conducto auditivo externo, entre el décimo tercer y décimo cuarto día empiezan a ingerir alimento sólido y agua del bebedero.

Generalmente se los desteta entre los 18 y 21 días de edad con un peso de 10 a 12 gramos.

Cuando no se ha utilizado el estro post-parto las hembras comienzan a ciclar a los 5 días post-destete. (Fox J., 2007)

Sistemas reproductivos

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

- El sistema reproductivo monogámico se realiza colocando un macho y una hembra en una misma caja. Este sistema se utiliza en las colonias 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 post-parto, 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.
- El sistema reproductivo poligámico se realiza apareando un macho con 2 a 6 hembras. Antes del parto las hembras se llevan a cajas individuales, lo que naturalmente impide aprovechar el celo post-parto. Vuelven a la caja común luego del destete. 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 (Benavidez F., 2003).

Ciclo estral

Tiene una duración de 4 a 5 días, y el celo propiamente dicho dura aproximadamente 12 horas. Durante la lactación se interrumpe la periodicidad ovárica.

En el ratón se producen tres efectos reproductivos muy importantes a tener en cuenta en el manejo de una colonia. El efecto Lee-boot que se produce cuando se colocan grupos homogéneos de hembras, todas ellas dejan de ciclar entrando en un anestro continuo. El Efecto Whitten que es aquél que se produce al agregar un macho o el olor de la cama de un macho, en ese grupo de hembras que se encontraban en anestro continuo, observando que a las 72 horas comienzan a ciclar todas juntas. Este efecto es muy importante porque nos permite sincronizar los celos. El Efecto Bruce es cuando una hembra cubierta por un macho determinado toma contacto físico o se expone al olor de otro macho en las primeras 48 horas de gestación, lo que produce una reabsorción embrionaria.

Las hembras no lactantes tienen un período de gestación que oscila entre 19 y 21 días. En las hembras lactantes éste aumenta entre 3 a 5 días en función al tamaño de la camada.

El diagnóstico de gestación se realiza por la presencia espermatozoides en los frotis vaginales, como así también por la presencia de un tapón vaginal formado por el semen gelificado que se observa en la vagina de la hembra luego de la cubrición o entre el lecho de la caja. Éstos son indicadores concretos que se ha producido la cópula en las 24 horas anteriores.

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. (Benavidez 2003)

Identificación

Existe una gran variedad de métodos para identificación: indirectos, temporarios y permanentes.

Los indirectos son las tarjetas que se colocan en cada jaula o caja con los datos de los animales.

La identificación permanente incluye caravanas de metal, muescas o tatuajes en las orejas y los implantes subcutáneos de microchips electrónicos, generalmente entre las escápulas para que no se desplacen. La amputación de los dedos no debe realizarse nunca. (Lotus W., 2005)

La identificación temporaria se puede realizar tiñendo la piel de los ratones albinos, cortando el pelo o haciendo marcas en la cola con tinta indeleble. Los dos primeros permiten la identificación por una o dos semanas y las marcas de tinta desaparecen en uno o dos días. Se realiza en la región dorsal de los animales permite la identificación de 10 animales albinos durante una semana.

Sujeción

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 de punta roma o pinzas de goma teniendo especial cuidado con los ratones agresivos ya que pueden darse vuelta y morder (Resasco A. 2018). Siempre debemos trabajar tranquilos al manipular al animal. Una vez que se sujeta por la base de la cola el ratón se lleva a la reja de la caja, donde pueda agarrarse, se lo toma por la piel laxa del cuello con los dedos índice y anular; la misma se la da vuelta y se sujeta la cola entre el meñique y la palma de la mano. En ningún caso se lo debe sujetar por la punta de la cola ya que podría arrancársele parte de ella. Las pinzas son excelentes para manipular ratones silvestres o agresivos, y también para tomar los recién nacidos.

Otra forma de sujetarlos es en forma de copa, donde se saca de la caja al animal colocando ambas manos juntas en forma de copa (o nido) y se lo traslada; otra es en forma de túnel donde se utiliza un tubo que generalmente es transparente, se introduce en la caja y se dirige al animal para que entre en este. Al principio pueden saltar, pero rápidamente se acostumbran a estos dos métodos.

También se han diseñado diferentes dispositivos, cepos, para la sujeción y la inmovilización de los ratones. Existen múltiples formas con una amplia variedad de materiales tales como: cuero, tela resistente, tubos plásticos o de acrílico transparente, etc. Muchos de estos dispositivos se diseñaron para facilitar la inoculación endovenosa en la cola, colecta de sangre o irradiación. Todos deben contar con una ventilación adecuada y deben ser de fácil limpieza y desinfección.

Sexado

La determinación del sexo de los animales se realiza por simple observación de la zona perianal a partir de las tres semanas (antes de la tercera semana es más difícil y requiere más experiencia). Para dicho propósito se evalúa la distancia entre la papila genital y la apertura anal, la cual es casi el doble en los machos que en las hembras. El tamaño de la papila genital es también ligeramente mayor en los machos. Como una alternativa, es posible observar la parte ventral de las crías, entre los días 9 y 15, y distinguir a las hembras por la falta de pelo alrededor de los pezones. También es posible observar una pequeña mancha negra en el escroto de los machos pigmentados desde el primer día de vida (Benavidez 2003)

Administración de drogas y compuestos o sustancias

En la selección de la vía a utilizar depende de múltiples factores, entre ellos debemos considerar: el pH, la osmolaridad y estabilidad de la sustancia; el efecto y tasa de absorción; la

compatibilidad y solubilidad; y si serán dosis única o múltiple. También es importante tener en cuenta el volumen total, que se expresa en mililitros por kilogramo de peso. Existen variaciones leves asociadas a la cepa, edad y sexo.

Estos procedimientos deben llevarse a cabo por personal entrenado en la ejecución de los mismos y siempre deben ser previamente aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL). Se debe tener en cuenta los volúmenes permitidos en esta especie, volúmenes excesivos puede llevar a una pérdida del bienestar de los animales, en cualquier caso, los valores deben ser ajustados según los requerimientos farmacológicos. En caso de ser necesario administrar volúmenes mayores a los permitidos, el procedimiento debe ser consultado con el coordinador responsable y se deben manejar varios sitios de inoculación (Morton B, Turner P., 2011).

Tópica

La aplicación tópica de los compuestos se realiza generalmente sobre la piel depilada en la zona del dorso del animal. Este es un procedimiento fácil, se debe evitar el lamido para que el animal no ingiera los compuestos aplicados. Se han desarrollado diversos dispositivos para este propósito como por ejemplo collar de Isabelino, bandas y tubos de vidrios para la cola.

Oral

La forma más fácil de administrar un compuesto por vía oral es mezclándolo con la comida o el agua de bebida, pero si le dan un sabor desagradable se reduce considerablemente su consumo. Para asegurar la administración oral de un compuesto se requiere de un sistema de infusión intragástrica continua. Se debe tener un amplio conocimiento de la anatomía de la zona orofaríngea, ya que el orificio esofágico es difícil de observar en los ratones vivos. Para introducir la sonda, el animal debe sujetarse con firmeza y es importante asegurarnos que la cabeza y el cuello queden extendidos formando una sola línea con la espalda. Se introduce la sonda del lado izquierdo por la comisura de los labios en forma lenta y suave a lo largo de la rama mandibular. En este punto el ratón comienza a tragar y la sonda se inserta dentro del esófago, aprovechando el reflejo de deglución. Existen diversos tipos de sonda, se debe tener en cuenta que siempre sea de punta roma y que su largo permita llegar hasta el extremo del esternón. El volumen a inocular es de 0.5 - 1.0 ml.

Subcutánea

La inyección subcutánea (en un volumen de 0.5 a 1 ml en el ratón adulto) se realiza en la piel laxa del cuello usando agujas de medida 26 ½ G. La aguja se inserta debajo de la piel paralela a la columna vertebral.

Intradérmica

La inyección intradérmica se usa para estudios de reacciones inmunológicas o para medir respuesta inmune. También se utiliza la piel depilada en la zona de la espalda y si vemos que

se forma el habón (ampolla que forma el líquido) nos indica que fue bien realizada. Se puede inocular 0,1 ml por sitio de inyección o 0,05 ml en el pulpejo palmar o plantar. La aguja utilizada para esta maniobra es de medida 27G

Intracraneal

Esta vía se utiliza para el ensayo de virus neurotrópicos como por ejemplo el virus rábico, se utilizan animales lactantes. La aguja de medida 27 G para neonatos y de medida 24 G para lactantes. Se inserta bajo la piel en la región central del hueso parietal, lateralmente a la sutura central, esto evita alcanzar el seno venoso transversal. Se rota la aguja lentamente hasta que traspase el hueso, y luego se avanza hasta una profundidad de 1 a 4 mm dependiendo del tamaño del ratón. Se puede inyectar entre 0,015 a 0,03 ml en neonatos y lactantes respectivamente. Las soluciones deben tener una temperatura cercana a la del cuerpo, y luego de la inyección los animales deben mantenerse en lugares templados para reducir la posibilidad de shock.

Intramuscular

Esta vía es muy poco usada, debido a la pequeña masa muscular del ratón. Se utiliza esta vía para sustancias oleosas, siendo el inoculo de 0,05 ml. La inoculación se realiza en la región anterolateral del muslo (grupo de músculos cuádriceps femorales), o en la parte posterior cuidando no dañar el nervio ciático. Utilizando agujas medida 22 a 26 G. Se introduce la aguja en la masa muscular y se lleva el embolo de la jeringa hacia atrás para asegurarnos que no estemos en un vaso sanguíneo, si comprobamos que no estamos dentro de un vaso sanguíneo hacemos la descarga del inoculo.

Intraperitoneal

Para evitar lesionar el hígado, estómago, bazo o ciego la inoculación intraperitoneal debe realizarse en el cuadrante inferior derecho del abdomen. El ratón se coloca en cúbito dorsal levemente inclinado hacia craneal, para que se produzca el desplazamiento de las vísceras hacia adelante. Se divide el abdomen en 4 cuadrantes y luego se inserta la aguja en el cuadrante inferior derecho. Atravesamos piel, se desliza la aguja hacia craneal 1 o 2 mm y se introduce en la cavidad abdominal perpendicularmente a la columna vertebral; esto se hace para evitar que los orificios de inoculación coincidan y se pierda líquido de inoculo o se produzca una contaminación por gérmenes. El volumen a inocular por esta vía es hasta 1 ml, con agujas 23 – 26G

Intravenosa

Esta inoculación se realiza en las venas laterales y dorsal de la cola, es difícil de realizar, se debe inmovilizar previamente al ratón y dilatar las venas con alcohol o calor. Debemos comenzar por la parte más caudal para poder tener intentos sucesivos hacia craneal de la cola en caso de fallar. Si se hace en forma apropiada el líquido fluye fácilmente. En los ratones albinos

las venas se visualizan fácilmente, siendo más difícil en los animales con manto de color. Otros sitios para la inoculación intravenosa puede ser la vena yugular externa, la vena metatarsiana dorsal y la vena sublingual. El volumen a inocular es de 0,01 a 0,2 ml. Las agujas a utilizar dependen del tamaño del ratón, siendo las medidas de 26 a 30 G.

Extracción de sangre

Se han desarrollado varias técnicas para la extracción de sangre en ratón.

El seno orbital no se utiliza más por ser muy doloroso.

Vena maxilar externa

Lateralmente de la mandíbula, sobre la rama mandibular generalmente coincide con el lugar donde el ratón presenta un lunar sin pelo. Se puede realizar con aguja o lanceta. Se obtienen pequeños volúmenes de sangre recogiendo las gotas en tubos eppendorf.

Vena safena

Esta vena atraviesa en forma inclinada la cara externa del muslo. Se rasura y desinfecta la zona y se ejerce una ligera presión para ingurgitar la vena. Se puede realizar con aguja o lanceta. Se obtienen pequeños volúmenes de sangre recogiendo las gotas en tubos eppendorf.

Intracardiaca

Se pueden obtener grandes volúmenes de sangre directamente por punción cardíaca, utilizando diferentes técnicas. Siempre con el animal anestesiado. Se coloca al ratón en decúbito dorsal, se ubica la apófisis xifoides del esternón y se inserta la aguja perpendicularmente a la columna vertebral formando con ella un ángulo de 45°. Si punzamos el corazón se va a sentir el choque cardíaco, se aspira el émbolo y comienza a fluir la sangre. Otra forma es punzar entre el tercer y cuarto espacio intercostal izquierdo, palpando el choque cardíaco. Se utilizan agujas son de 20 a 25G.

En el ratón adulto se obtienen entre 0,8 a 1 ml dependiendo el tamaño y la edad del animal cuando se realiza sangría a blanco.

Cuando la extracción de sangre se debe realizar en forma periódica o seriada debemos tener en cuenta los volúmenes y el tiempo entre una extracción y otra, además de la vía por la cual podemos realizarla. El volumen de sangre dependerá del peso corporal del ratón, se puede sangrar el 1 % del peso corporal cada 2 semanas, el 3% del peso corporal una vez al mes y el 6 % cuando es sangrado a blanco. Por ejemplo, si queremos obtener un volumen del 1% del peso de un ratón de 20 gr., sangramos hasta 0,2 ml, del 3% sangramos 0,6 ml. y del 6% obtenemos hasta 1,2 ml.

Características anatómicas particulares

Cavidad oral

Presenta una dentición monofiodonte, o sea un solo, juego de dientes permanentes. La fórmula dentaria es 2 (I 1/1, C 0/0, PM 0/0, M 3/3) = 16. Los incisivos son hipsodontes, o sea de raíz abierta y crecimiento continuo (por lo que deben roer para desgastarlos), mientras que el resto son braquiodontes.

Ojos

Se encuentran protruidos de la cabeza y son susceptibles a presentar ulceraciones u opacidad corneal.

Glándula de Harder

Se localiza dentro de la órbita ósea. Sus secreciones son pigmentos porfirínicos rojos. Esta secreción se produce ante situaciones de estrés. Y puede confundirse con sangre.

Nódulos linfáticos

Se localizan superficialmente, subcutáneamente, entre músculos y profundamente entre vísceras y cavidad torácica. Son difíciles de observar en animales sanos haciéndose más evidentes en animales que padecen alguna infección, aumentan de tamaño y se observan color rojizo.

Timo

Es par, de forma triangular y está localizado ventralmente de la tráquea. Esta glándula es mayor en animales pequeños, alcanza su tamaño máximo en la madurez sexual, luego disminuye.

Corazón

Se encuentra a lo largo de la línea media del tórax, rodeando de los pulmones. El ápice se encuentra muy cerca del diafragma. Su tamaño en un animal adulto es un poco menor a 1 cm de diámetro.

Pulmones

Presentan un lóbulo simple el izquierdo y 4 lóbulos el derecho. La tráquea está formada por cartílagos incompletos en forma de C, en cambio en los bronquios este cartílago es completo.

Grasa Parda

Conocida también como "glándula de la hibernación", se encuentra entre las escápulas, en la región axilar y cervical. Juega un rol importante en la termogénesis y como reserva de carbohidratos.

Estómago

Se encuentra dividido en 2 regiones, una no glandular, clara y de pared delgada; y otra glandular, de color rosado y paredes espesas que limita con el duodeno.

Hígado

Está compuesto por 4 lóbulos y representa el 5% del peso total del animal adulto. La vesícula biliar se encuentra cerca del lóbulo medio.

Bazo

En forma de lengüeta se dispone a lo largo de la gran curvatura del estómago.

Glándulas mamarias

Presenta 5 pares de mamas.

Referencias

- Benavides F.J. y Guénet J.L. (2003). Manual de Genética de Roedores de Laboratorio Universidad de Alcalá de Henares y la SECAL, España.
- Dhanjal, P. (1991). The Assessment of Stress in Laboratory Mice due to Olfactory Stimulation with Fragranced Odours (MSc project dissertation in toxicology). University of Birmingham.
- Fox J., Barthold S., Davisson M., Newcomer C., Quimby A., (2006) The Mouse in Biomedical Research: Normative Biology, Husbandry, and Models. Volume3. American College of Laboratory Animal Medicine, *Volume (3)* 2nd Edition. USA
- Fox J., Davisson M., Barthold S., Newcomer C., Quimby A., (2007). The Mouse in Biomedical Research History, Wild Mice, and Genetics. *Volume (2)* i. American College of Laboratory Animal Medicine Book • Second Edition. USA.
- Green E. (1975). Biology of the laboratory mouse. 2nd ed. Dover Publications, New York. USA
- Lotus W.(2005). A primer on rodent identification methods Laboratory Animal *Volume (34)*, N^o. 4, 64-67.
- Morton B., jennings S., Buckwell A., Ewbanck R., Godfrey C., Holgate B., Ingles R., James R., Page C., Sharman I., Verchosley R., Westall L. and Wilson A. (2002) Refinando los procedimientos para la administración de sustancias. Laboratory Animas. SECAL. España.
- Resasco A., (2018). *Título:* Impacto del desarrollo de la línea tumoral A549 en el bienestar de ratones de la cepa NLAE:NIH(S)-Fox1nu/nu, Tesis doctoral repositorio de la Facultad de ciencias Veterinarias de Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Turner P., Brabb T., Pekow C. and Vasbinder M. (2011).Administration of Substances to Laboratory Animals: Routes of Administration and Factors to Consider. *Vol (50)*, N^o 5, 600–613
- Zúñiga JM., Orellana M. y Tur Marí J. (2015). Ciencia y Tecnología del Animal de Laboratorio Universidad de Alcalá de Henares - SECAL España.

CAPÍTULO 12

La rata como animal de experimentación

Pilar Cagliada

La rata de laboratorio es la variedad doméstica de la rata noruega marrón, (*Rattus norvegicus*), la cual se encuentra en climas fríos, templados y subtropicales de Europa y Norteamérica. En la actualidad es una especie cosmopolita.

Taxonomía

Clase: Mamífera

Orden: Rodentia

Familia: Muridae

Género: *Rattus*

Especie: *Rattusnorvegicus*

La clasificación de las ratas de la familia Muridae y especialmente aquellas que viven en contacto con el hombre es muy confusa. Muchos expertos creen que la rata noruega es una especie distinta de las otras ratas, como por ejemplo la rata del tejado y la doméstica, mientras que otros opinan que es una subespecie de la rata de barco *Rattus rattus* (género y especie). El nombre de rata noruega fue aplicado por primera vez por Berkenhout, quien en 1769 le dio el nombre científico de *Mus norvegicus*. Ahora se acepta que estas ratas pertenecen al género *Rattus*. La *Rattus norvegicus* no se reproduce cuando se la cruza con *Rattus rattus*

Origen e historia

Se piensa que el hábitat original de la rata silvestre marrón (*rattus norvegicus*) fueron las áreas templadas desde el mar Caspio al norte de China y oeste de la India. La rata noruega también acompañaba a las caravanas terrestres y fue así que se diseminó en toda Asia, llegando al continente europeo a principios del siglo XVIII. Esta especie llegó a Ingla-

terra antes del año 1730 y al continente americano por medio de los barcos a mediados y fines del siglo XVIII.

La rata común (*Rattus rattus*) tiene su origen en el sudeste asiático y migró al oeste desde China e India y desde allí a toda Europa a través de los barcos que viajaban al sur de Europa, en los siglos XI y XII, donde produjo las grandes plagas. En el año 1548, los barcos de los exploradores europeos la llevaron a la costa Este de América del Norte.

La rata noruega es un animal más grande y fuerte que la rata común o rata negra y cuando se encuentran en el mismo ambiente la primera domina sobre la segunda.

En los edificios o viviendas las ratas noruegas prefieren los sótanos o pisos inferiores, mientras que las ratas negras prefieren los áticos y cubrera de los techos. Actualmente en las grandes ciudades modernas solamente se ha adaptado la rata noruega a convivir con el hombre.

Rattus norvegicus ha sido la primera especie de mamífero domesticada para propósitos científicos. El registro más temprano de cría de ratas albinas y silvestres para experimentación fue en Alemania en el año 1877; previamente, en Francia e Inglaterra se usaban esporádicamente dichos animales en estudios de fisiología. En EE.UU. comenzaron a utilizarse en investigación alrededor del año 1890, stocks que fueron importados de un laboratorio de Suiza.

El "padre" de la rata albina de laboratorio fue el fisiólogo americano Henry H. Donaldson, quien comenzó a estandarizar colonias en el año 1906, cuando era director del Instituto Wistar en Filadelfia. En 1915 Donaldson publicó un amplio informe sobre los datos biológicos de la rata noruega. La segunda edición publicada en 1924 sirve como estándar para estudios comparativos de la rata domestica con la silvestre. Debido a que existen algunas similitudes entre la rata y el humano, desde el punto de vista biológico, Donaldson le dio prioridad a esta especie con respecto a otras, por ejemplo, tienen los mismos hábitos alimenticios y en algunas circunstancias si se usan equivalencias con respecto a la edad los resultados obtenidos pueden transpolares al hombre.

Las variedades domésticas albina de la rata noruega son las más utilizada en investigaciones biomédicas. Esto se justifica teniendo en cuenta el volumen de información existente acerca de ella, su fácil manejo y relativa rusticidad. Por tener mayor tamaño que el ratón es que se la utiliza mucho en cirugía experimental.

Biología general

La rata es un animal con una alta adaptabilidad, al igual que el ratón, es capaz de sobrevivir a una amplia variedad de condiciones climáticas y de hábitats. Puede ser solitaria o vivir en grandes grupos. En la naturaleza compite con el hombre por el alimento. El hacinamiento combinado con la escasez de alimento puede llevarlas a competir entre ellos sucumbiendo los más débiles. En el laboratorio, el canibalismo se evita con la alimentación *ad-libitum*.

Los sentidos del olfato y auditivo están muy desarrollados, la rata puede oír altas frecuencias, por encima de 80 kHz en el rango ultrasónico. La máxima sensibilidad de audición se sitúa en un rango de 15 a 25 kHz. Se alteran por sonidos de muy baja frecuencia, por lo que hay que tener cuidado con los equipos que se utilizan dentro del bioterio o en sus cercanías (Green E. 1975). Su visión es pobre, la retina está compuesta casi enteramente de rodositos y no muestra células de Purkinje. Es prácticamente ciega a la luz de longitud de onda del rojo, la visión en colores no existe, pero es eficaz ante a la luz de baja longitud de onda. Los receptores táctiles están particularmente bien desarrollados sobre la cabeza, alrededor del hocico, sobre la cola y en las patas. Usa la cola para la orientación sobre el terreno y equilibrio durante el salto; y es el principal órgano de regulación de la temperatura, entre el cuerpo y el medio ambiente, ya que no posee glándulas sudoríparas y no puede jadear. La rata tiene un gran instinto exploratorio, pero es cautelosa y evita el peligro. Acostumbra a repetir estímulos por lo que puede ser entrenada para tolerar procedimientos no placenteros, tales como inyecciones repetidas, u otras maniobras con escaso dolor.

Es capaz de controlar su consumo de alimento dejando o almacenándolo en la caja, pero puede volverse obesa si no tiene suficiente espacio como para hacer ejercicios. En la naturaleza o en condiciones limitadas de comida o espacio roe todo, aun metales como el hierro haciendo que los dientes incisivos se afilen, rompiendo las cajas o contenedores y escapándose. Las ratas normalmente van en busca de comida y retornan al nido luego de una excursión nocturna, viven frecuentemente en depósitos de basura y lugares sucios, sin embargo, presenta hábitos de higiene; para lavarse utiliza sus patas humedecidas con saliva.

Es un animal activo, de hábitos nocturnos, se alimenta durante la noche; y hace la digestión, descansa y duerme durante el día. En condiciones de laboratorio come durante la noche y también durante el día. Especialmente cuando realiza la digestión las ratas pueden manejarse con más facilidad. Con el contacto constante en el bioterio se vuelven dóciles y amigables.

Normalmente estos animales viven más de tres años, si están en buen estado de salud, pero la mayoría de ellos cuando son convencionales y no están controladas presentan enfermedades respiratorias progresivas, por lo que la longevidad del animal en esas circunstancias sería de un año o año y medio. En el caso de los animales SPF el promedio de edad superaría los tres años. La vida reproductiva se extiende hasta los 14 meses de edad, en dicho periodo puede producir entre 6 y 10 camadas, dependiendo de la cepa.

Comportamiento

El comportamiento de la rata de laboratorio depende fundamentalmente del tamaño y tipo de caja donde se alojan, número de animales, de las condiciones ambientales y de manejo.

Los machos son más agresivos y por lo general muerden más que las hembras. Pero la agresión es realmente rara, de forma que, al contrario de lo que ocurre con los ratones, los

machos pueden permanecer alojados en grupo; pero si hay peleas alguno puede resultar muy mal herido. (Fox J. 2006) Si se observan signos de agresividad, por ejemplo, heridas en el lomo o en la cola, hay que retirar de la caja tanto al agresor como al agredido. Las hembras también pueden mantenerse en lotes homosexuales; en los que puede presentarse algunas veces agresividad, es entre los lactantes. Si bien tienen cierta tendencia a escapar de sus jaulas, siempre regresan a las mismas para obtener alimento y bebida.

Cuando se coloca el macho con la hembra, este siempre está listo para el apareamiento, pero la hembra sólo lo acepta en la fase temprana del estro. Durante el apareamiento la hembra se queda inmóvil y muestra lordosis pronunciada. Los machos montan a la hembra y la cópula dura varios segundos. Los machos y las hembras pueden mantenerse en la misma caja, pero es aconsejable sacar al macho antes del parto y durante la lactancia. Unos días antes del parto la hembra prepara el nido. El neonato permanece en el mismo cubierto con el material de la cama para mantener su temperatura corporal, pero si el ambiente está muy caluroso, intenta salir del nido.

Cuando se colocan juntas hembras jóvenes y sin aparear en la misma caja, se puede observar un comportamiento peculiar: arrastran a sus compañeras por la cola o intentan hacerlo tomándolas por la piel laxa del cuello, provocando heridas. Este comportamiento anormal indica que es necesario un cambio en su microambiente, si colocamos una hembra nueva en la caja, o algún elemento que llame la atención como un trozo de madera, papel, pellets, granos o semillas, se puede eliminar o minimizar esta conducta. Las hembras más viejas tienden a aislarse en un rincón de la caja.

Es muy raro observar canibalismo, esto puede indicar mal manejo de la colonia. Si a estos animales se los trata mal o hay deficiencias nutricionales, por ejemplo, avitaminosis, pierden su docilidad normal y agreden a las personas que las manejan; esta agresividad latente puede ser contagiosa. Pero si se las maneja en forma correcta y suave son sumamente mansas. Como son animales de hábitos nocturnos durante la noche el comportamiento cambia abruptamente, son muy activas, corren por toda la caja, juegan, se reproducen, etc.

Variedades

La primera colonia de producción de *Rattus norvegicus* se estableció mediante la exocría de dichos animales. La endocría de ratas comenzó en el Instituto Wistar de Filadelfia en 1909 y la distribución a distintas instituciones de EE.UU., Europa y otras partes del mundo data del año 1911. Casi el 40% de las cepas endocriadas actuales derivan de la cepa Wistar. Dichas cepas a pesar de tener raíces comunes presentan grandes diferencias fenotípicas y tienen una amplia variabilidad genética.

Haremos una breve descripción de las tres cepas mas importantes de las que derivan la mayoría de las cepas actuales:

Wistar

Fue desarrollada por el Instituto Wistar de Filadelfia, Pennsylvania. Es un animal tranquilo, moderadamente prolífica, y se encuentra actualmente en los laboratorios de todo el mundo. Es bastante resistente a las infecciones y tiene baja incidencia a formar tumores espontáneos. Es albina. Su cabeza es ancha y las orejas son largas, el largo de la cola es siempre menor que el largo del cuerpo.

Sprague-Dawley

Fue desarrollada por la granja del mismo nombre, en Madison, Wisconsin. Es de crecimiento más precoz que la anterior y más prolífica. Albina también, pero son más estilizadas. La cabeza es más larga y más estrecha, con orejas más pequeñas. La cola es más larga, Son menos resistentes a las infecciones, pero tienen mucha susceptibilidad a contraer enfermedades respiratorias.

Long-Evans

Es la más pequeña de las tres, y en su color de capa tiene una caperuza negra sobre la cabeza que se extiende hacia la parte posterior del cuello y hombros.

Usos en el laboratorio

Hasta hace poco tiempo, después del ratón, la rata fue el mamífero que más se utilizaba en investigación; pero actualmente fue reemplazada por el pez cebra, quedando así en tercer lugar.

Se han utilizado para investigaciones de todo tipo: Biomedicina, comportamiento y control de calidad de especialidades farmacéuticas. Por medio de la selección y mutaciones genéticas existen numerosos modelos; por ejemplo: ACI con anomalías urogenitales congénitas; ratas CAR y CAS resistentes y susceptibles a caries dentales respectivamente, SHR ratas hipertensas espontáneas, y muchos ejemplos más. (Fox J., 2006)

La gran adaptabilidad y resistencia hace de este animal un modelo apropiado para una gran variedad de investigaciones, obteniéndose numerosos avances en endocrinología, bioquímica, teratología, gerontología, comportamiento, investigaciones cardiovasculares, inmunología, odontología, parasitología, inmunogénica, farmacología, toxicología, fisiología experimental, neurofisiología y oncología. También se lo utiliza en investigaciones sobre nutrición teniendo en cuenta la alta tolerancia que estos animales presentan frente a deficiencias alimenticias. Se utiliza particularmente para entrenamientos en técnicas de microcirugías y trasplantes.

Producción

Macroambiente

La temperatura y la humedad relativa en las habitaciones es igual que para el ratón, 22 +/- 2 °C de temperatura y entre el 50 y 60% de humedad. Cuando la humedad está por debajo de este valor, sumado a una temperatura elevada también se produce el fenómeno de la cola anillada (ring tail) o problemas en el oído medio (CCAC Guide 2020).

La ventilación es muy importante deben realizarse entre 10 y 15 cambios de aire por hora en las salas, ya que la concentración de amoníaco es tóxica e irrita el tracto respiratorio de las ratas. (Zúñiga 2015).

Son animales muy sensibles a los polvos irritantes del medio ambiente (aserrín, polvillo del alimento), a los gases (amoníaco y sulfurados). Una de las primeras respuestas hacia estas irritaciones es el aumento de la actividad de las células calciformes del epitelio traqueal y bronquial. La irritación severa y crónica produce una firme acumulación de tejido linfático a nivel pulmonar, en la bifurcación bronquial, bronquiolos y alrededor de los vasos sanguíneos. En este estadio una infección con cualquiera de los patógenos respiratorios como por ejemplo *Mycoplasma sp.*, *Pasteurella sp.* o Virus Sendai, puede llevar a una enfermedad pulmonar progresiva de la cual el animal nunca se recupera completamente. Por eso es muy importante colocar un buen filtro de aire para prevenir estos inconvenientes. Los ruidos afectan menos a las ratas que a los ratones, aunque cuando estos son muy intensos se observa canibalismo de las crías. La iluminación es tan importante en la rata como en el ratón para la regulación del ciclo estral y reproductivo, 12 horas de luz /12 horas de oscuridad. (Zúñiga 2015). La iluminación demasiado brillante o fuerte puede causar degeneración retiniana y cataratas, así como alteraciones del comportamiento y la reproducción (menor número de camadas o disminuir el tamaño de la camada y aumento de peso durante la gestación) Se ha demostrado en investigaciones recientes que la exposición crónica a la luz LED que emite luz azul (460 nm) es perjudicial para las ratas, lo que requiere un enfoque cauteloso si se utiliza este tipo de luz como la fuente primaria de iluminación (CCAC Guide 2020)

Microambiente

Las cajas o jaulas pueden ser plásticas de policarbonato, polipropileno o metálicas, con tapas enrejadas de acero inoxidable similares a los ratones, pero de mayor tamaño. Los animales adultos con un peso corporal aproximado de 300 gr., tienen una exigencia de espacio de alrededor de 250 cm². Las hembras en periodo de lactación necesitan un espacio mayor para su camada, 1000 cm².

Las ratas no poseen glándulas sudoríparas, solo se encuentran unas pocas en la almohadilla plantar. Al igual que en el ratón, la principal fuente de pérdida de calor es la cola, por mecanismo de vaso dilatación se produce la disipación del calor hacia el medio ambiente. Si las ratas están muy hacinadas y la temperatura ambiente es elevada, hace que falle este sistema termorregulador, pero tienen un último mecanismo de defensa, salivan copiosamente (tienen muy desarrolladas las glándulas salivares) y cubren todo su cuerpo con saliva, a esto se lo denomina *wet fur* (del inglés: pelo mojado); finalmente si este procedimiento falla, la rata morirá rápidamente de hipertermia. Solo se recomienda alojarlas individualmente cuando es necesario para un estudio en particular, como por ejemplo en jaulas metabólicas, y el menor tiempo posible (CCAC Guide 2020)

Al igual que en el ratón el lecho o cama más recomendable es la viruta de álamo blanca, papel o marlo. También pueden confeccionarse con alfalfa, etc., es decir de materiales absorbentes, libres de polvo, atóxicos, y en lo posible, que no produzcan alergias, que no tiñan a los animales y que sean esterilizables.

La higiene del lecho o cama se realiza con la frecuencia que se estime necesaria, con el objeto de mantener los animales limpios y secos. En general, de 1 a 3 cambios por semana es suficiente, dependiendo de la densidad de animales por caja o jaula y de la ventilación del ambiente; una limpieza excesiva perturba las marcas olorosas y estresa al animal (Resasco A. 2018)

La alimentación es *ad libitum* igual que en el ratón. El alimento para las ratas SPF puede esterilizarse por medio de radiación (a este se le deben agregar antioxidantes) o por autoclave (éste debe ser reforzado con vitaminas). La irradiación se realiza con una fuente de cobalto 60 con rayos gamma y la dosis utilizada en este caso es de 2,5 MegaRad (Zúñiga 2015).

En cuanto al agua se suministra *ad libitum* en mamaderas igual que en ratón, en lo posible estéril, clorinada o acidificada con ácido clorhídrico hasta pH 2,5-2,8. Los animales adultos con un peso de 300 gr. consumen aproximadamente 5 gr. de alimento y 10 ml. de agua por cada 100 gr. de peso vivo por día, aunque dicho consumo varía en función de la temperatura y humedad ambiental, el estado sanitario, momento reproductivo y la composición y calidad del alimento. (Zúñiga 2015).

Programa reproductivo

Su ciclo es igual que el ratón. Son poliéstricas continuas, (ciclan cada cuatro días), con ligeras variaciones estacionales en cuanto a la fertilidad. Tras el parto, a las 48 hs. se produce un celo fértil. Si este celo se utiliza se produce un retraso de 3 a 5 días en la implantación de los embriones, lo que impide precisar, exactamente, las fechas de los partos, dificultando el manejo y programación de la colonia. Al nacer pesan, aproximadamente 5 gr. Al igual que el ratón nacen desnudos, con el conducto auditivo, ojos cerrados y sin dientes. Si son albinos, son de

color rojo escarlata y luego de 2 días de color rosado. La rata es muy activa y a la hora de nacer ya es capaz de mamar. El pelo comienza a aparecer al cuarto día y a los 10 días ya están completamente cubiertos. Hacia el 13^{er} día comienzan a abrir los ojos y oídos externos, hacia el día 16^{to} comienzan a ingerir alimento sólido y a tomar agua.

El destete se realiza a los 21 días, igual que el ratón, con un peso de 40-50 gr. De no haberse producido la cubrición en el estro post-parto, el ciclo se reinicia a los 2-4 días posteriores al destete. (Fox J., 2007)

Los sistemas de cría los podemos clasificar en monogámico y poligámico:

Sistema monogámico

Es el apareamiento continuo del macho con la hembra, separando las camadas obtenidas al destete, antes de que se produzca un nuevo nacimiento. Con este método se necesita disponer de un gran número de machos, de cajas y mayor cantidad de personal. Pero tiene la ventaja de poder utilizarse el estro post-parto. Este tipo de sistema se utiliza en los stocks de fundación.

Sistema poligámico

Se coloca un macho con 2 a 6 hembras. Inmediatamente antes del parto, cada hembra es llevada a cajas individuales, no se utiliza el estro post-parto. Tiene la ventaja de que las hembras producen mayor cantidad de leche, se obtiene un mayor número de camadas y se utilizan menor cantidad de machos. La hembra tras el destete regresa nuevamente a la jaula común con el macho. (Benavidez F., 2003).

Ciclo estral

Al igual que en el ratón la duración del ciclo es de 4-5 días, el celo dura 12 hs aproximadamente, y se produce casi siempre durante la noche.

El efecto Lee-boot también se produce en esta especie. El efecto Witthen se da con menor intensidad que en las ratonas, pero la diferencia es que en esta especie no se produce el efecto Bruce.

La gestación, igual que el ratón es de un promedio de 21 días. También en la rata para detectar preñez se observa el tapón vaginal a las 12-14 hs. luego de la cópula, que a veces se desprende y lo vemos entre el lecho. Este tapón nos asegura el apareamiento y un alto porcentaje de preñez. También se puede constatar por la presencia de espermatozoides en frotis vaginales. La pseudogestación es rara, cuando ocurre tiene una duración aproximada de 13 días. En general el tamaño de la camada oscila entre 6 a 12 crías, dependiendo de la cepa y se reduce, así como la fertilidad, tras el octavo o décimo parto.

Tanto en el macho como en la hembra se puede producir infertilidad por falta de vitamina E, es permanente en el macho, pero reversible en la hembra. Otra causa de infertilidad en el macho es la temperatura ambiente muy elevada.

Con el objeto de obtener camadas más numerosas y vigorosas se aconseja no cubrir a las hembras antes de los 55-90 días de edad, cuando han alcanzado un peso corporal de 250 gr. (Benavidez F., 2003).

Manejo

La rata posee un temperamento tranquilo, aun cuando se la someta a tratamientos continuos o no se maneje por largos periodos. Son pacíficos si se los maneja correctamente y se adaptan muy fácilmente a la manipulación. Antes de proceder a la administración de inyecciones, marcaciones, etc., es aconsejable cubrir la cabeza con un paño de tela, lo que tranquiliza mucho al animal y realizar una correcta sujeción para que no pueda escapar, morder, o herir al operador. Y en estas maniobras deben trabajar de a dos operadores.

Sujeción

La rata adulta debe levantarse por la base de la cola, suavemente y durante poco tiempo ya que le puede causar dolor y pánico haciendo que gire sobre sí misma, pudiendo desprenderse la piel de la cola.

Una vez fuera de la caja debemos tomarla firmemente inmovilizando la cabeza con los dedos índice y medio rodeando el cuello, el pulgar y el resto de los dedos rodean el tórax. Si el animal se coloca decúbito dorsal para realizar alguna maniobra, colocándole el dedo pulgar debajo del mentón, las ratas estarán más relajadas. Si el ejemplar es grande, (más de 250 gr.) se usa la otra mano como soporte del tren posterior. El éxito de este método dependerá de la presión aplicada inicialmente al tomar la rata: mucha presión dificulta la respiración y si no es suficiente el animal intentará huir.

Hay que tener mucho cuidado cuando la hembra está en avanzado estado de preñez, dándole un buen sostén en los cuartos posteriores. Cuando se manejan ratas con camada siempre hay que esperar que la madre salga del nido. Y si se manejan los neonatos se debe retirar previamente la madre de la caja.

Identificación

Para la identificación se utilizan los mismos métodos que en ratón, los permanentes: las caravanas de metal en orejas no son aconsejables porque el animal se las arranca y se lastiman; muescas o tatuajes en las orejas; y los implantes subcutáneos de microchips electrónicos. Los tatuajes en la cola se deben realizar con anestésicos locales como aerosoles. (Resasco A. 2018). Los temporarios con tinta en el dorso de las ratas albinas, corte

de pelo o marcas en la cola con tinta indeleble para ensayos cortos, utilizando los mismos códigos que en ratón (Lotus W., 2005). Y los métodos indirectos corresponden a las tarjetas que se colocan en cada jaula o caja.

Sexado

Se realiza a través de la distancia ano genital igual que en el ratón. Los testículos son evidentes a edades muy tempranas especialmente si el animal se sostiene en forma vertical, lo que produce el paso de dichos órganos al escroto. Los machos poseen, asimismo, una amplia papila genital y una distancia urogenital superior a la de las hembras (5 mm en los machos y 2,5 mm en las hembras de 7 días de edad). También se pueden distinguir las mamas en las hembras entre el 8^{vo} y 15^{to} días de edad por falta de pelo alrededor de los pezones. (Benavidez F., 2003).

Administración de drogas y compuestos

Al igual que en ratón la selección de la vía a utilizar depende de múltiples factores: el pH, la osmolalidad y estabilidad de la sustancia; el efecto y tasa de absorción; la compatibilidad y solubilidad; y si se aplicarán dosis únicas o múltiples. También es importante tener en cuenta el volumen total, mililitros por kilogramo de peso. Existen variaciones leves asociadas a la cepa, edad y sexo.

Estos procedimientos deben llevarse a cabo por personal entrenado y siempre deben ser previamente aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL). Tener en cuenta los volúmenes permitidos en esta especie, volúmenes excesivos puede llevar a una pérdida del bienestar de los animales. En caso de ser necesario administrar volúmenes mayores a los permitidos, el procedimiento debe ser consultado con el coordinador responsable y se deben manejar varios sitios de inoculación. (Morton B, Turner P., 2002).

Tópica

Esta vía se realiza igual que en el ratón.

Oral

La vía oral se utiliza generalmente cuando se necesita una exposición sistémica, se sabe que la absorción gastrointestinal es buena y hay un escaso metabolismo de primer paso en el hígado. Se utilizan en investigaciones toxicológicas, para ver efectos locales en el tracto gastrointestinal, etc

La sustancia puede darse por boca o directamente en el estómago del animal:

Inclusión en la comida o el agua de bebida, es el método que más se asemeja a la ingestión de sustancias en humanos y es particularmente adecuado cuando se requiere una administración del compuesto de larga duración, por ejemplo, ensayos carcinogénicos. Aquellas sustancias altamente palatables pueden administrarse mezclándolas con el agua de bebida o la comida, o el animal puede tomarla directamente de una jeringa en forma voluntaria, con un pequeño entrenamiento diario.

Sonda gástrica: está técnica también evita los problemas de la palatabilidad y es el método más preciso para la administración de sustancias en el tracto gastrointestinal. Se realiza a través de una sonda gástrica en forma lenta. Una sonda adecuada debe tener un diámetro de 15 a 16 gauges, de 10 a 12 cm de largo y siempre punta roma. Para introducir la sonda, la rata debe sujetarse con firmeza y es importante asegurarnos que la cabeza y el cuello queden extendidos formando una sola línea con la espalda. Luego la sonda se introduce en la comisura de la boca por el espacio interdental (diastema) y utilizando el reflejo de deglución avanza lenta y suavemente para que sea fácil el pasaje dentro del esófago y/o estómago. Hay que tener mucho cuidado de que el tubo no penetre en tráquea. No puede realizarse con el animal anestesiado ya que se pierde el reflejo de deglución. En algunas ocasiones puede ser necesario restringir por periodos cortos de tiempo el consumo de agua o alimentos, no más de 2 a 4 horas por la alta tasa metabólica de estas especies. La administración de altos volúmenes puede llevar a distensiones severas del estómago y afectar la absorción de la sustancia.

Subcutánea

La inyección subcutánea se utiliza para la administración de grandes volúmenes, pero las sustancias a administrar no deben ser irritantes ni causales dolor. Igual que en el ratón se realiza en la piel laxa del cuello, la aguja se inserta en la piel paralela a la columna vertebral. El volumen del inoculo a administrar es 1 a 5 ml. Con agujas 26 1/2 G.

Intradérmica

La inyección intradérmica es una técnica utilizada frecuentemente en estudios de inflamación, sensibilización y diagnóstico del flujo sanguíneo y en inmunológica. A menudo el objetivo es administrar un antígeno de otra especie o un mediador inflamatorio y estudiar la reacción (edema, inflamación o enrojecimiento) que puede ocurrir rápidamente o después de un periodo de tiempo de minutos o días.

La inyección se hace normalmente en la piel del dorso igual que en el ratón. Se debe rasurar muy bien la zona al menos una hora antes de la inyección. Es muy importante realizar una sujeción firme, y asegurarse que la inyección sea intradérmica y no subcutánea, si se realizó correctamente observamos el habón. Se sitúa la aguja casi en paralelo a la superficie de la piel, con el bisel hacia arriba y se introduce cuidadosamente unos pocos milímetros dentro de ella. El volumen a inocular no debe exceder los 100 ul. La aguja a utili-

zar debe ser pequeña y aguda que sea capaz de penetrar la piel, 26 gauges para esta especie. Cuando se usan varios lugares de inoculación se debe procurar de que estén lo suficientemente separados para evitar la coalescencia.

Intramuscular

Vía sistémica. Se usa a veces, en estudios de liberación lenta en los que se emplean sustancias oleosas, para proporcionar una fuente desde donde la droga sea absorbida gradualmente. También se la utiliza para valorar vacunas y para administrar anestésicos. La inyección se realiza igual que en el ratón, pero a diferencia de éste la rata presenta una buena masa muscular, en la cara lateral y craneal del muslo (el grupo vasto) o en la cara posterior cuidando no dañar el nervio ciático. Se debe sujetar firmemente el miembro del animal y se introduce la aguja lenta y decididamente. Siempre tirar ligeramente hacia atrás el embolo de la jeringa antes de inyectar, para asegurarse de que la aguja no está dentro de un vaso sanguíneo. Se inyecta lentamente el contenido y al finalizar se masajea suavemente la zona. Es una inoculación muy dolorosa, tanto en el momento de la administración como posteriormente, por lo que puede darse una claudicación temporal. Esta vía debe usarse solamente, si no es posible utilizar una vía alternativa menos dolorosa. El volumen inyectado puede distender el músculo produciendo una inflamación en el lugar de la inyección. La aguja debe ser de 21-23 G y no debe superar los 0.1 y .02 milímetros.

Intraperitoneal

La inyección intraperitoneal se utiliza para administrar volúmenes relativamente grandes de sustancias solubles, cuando las sustancias que se administran se absorben rápidamente o cuando la vía oral o endovenosa no son apropiadas. Implica una inyección en la cavidad peritoneal a través de la pared abdominal.

Para evitar lesionar las vísceras, al igual que en el ratón se realiza en el cuadrante inferior derecho inferior del abdomen. El animal se sujeta en forma firme por un operador, en cúbito dorsal, levemente inclinado hacia craneal para que se produzca el desplazamiento de las vísceras. Otro operador realizará la inoculación. Atravesamos piel, se lleva la aguja hacia craneal 1 o 2 mm y luego se introduce en la cavidad abdominal perpendicularmente a la columna vertebral, para evitar que los dos orificios de inoculación coincidan. Se puede inocular hasta 1 ml, con agujas 23 – 26G

Endovenosa

La vía endovenosa se utiliza frecuentemente en experimentos farmacológicos, toxicológicos para simular la vía de exposición a formulación de drogas o productos de reposición de sangre; soluciones de nutrientes y agentes infecciosos o de diagnóstico. La vía asegura el éxito de la máxima exposición al plasma de la forma más rápida posible y evita la posibilidad de eliminación por el metabolismo entero-hepático.

Los vasos frecuentemente utilizados son las venas laterales de la cola, pero a diferencia del ratón, solo en su base (ya que por tener vaina son difíciles de visualizar). Más fáciles de visualizar en ratas jóvenes que en adultas. Por esto se aconseja dilatar los vasos, frotando o calentando la superficie, así se puede localizar mejor y cuando se inyecta correctamente el líquido fluye fácilmente.

La cantidad de inóculo es de 1 ml lentamente. Siempre es conveniente una buena inmovilización de la rata para evitar que la vena se colapse. El tamaño de la aguja debe ser de 23 G. Otras venas que pueden utilizarse son la yugular y la metatarsiana dorsal.

Extracción de sangre

Debemos tener en cuenta el volumen máximo de extracción que puede tolerar el animal en un procedimiento determinado. Esto se calcula teniendo en cuenta si la extracción será en una única toma o tomas progresivas en tiempos determinados; por ejemplo la extracción máxima es del 7,5 % del volumen sanguíneo total y las respuestas de recuperación varían (1 a 2 semanas) dependiendo del tiempo de extracción.

Se han desarrollado varias técnicas para la colección de sangre en rata.

Siempre el desarrollo de una buena técnica debe disminuir el dolor y malestar percibidos por el animal durante el procedimiento.

Vena maxilar externa

Igual que en ratón, lateralmente de la mandíbula, sobre la rama mandibular que casi siempre coincide con el lugar donde se observa un lunar sin pelo. La punción se puede realizar con aguja o lanceta. Se obtienen pequeños volúmenes de sangre recogiendo las gotas en tubos eppendorf.

Vena safena

Al igual que el ratón esta vena atraviesa en forma inclinada la cara externa del muslo. Se rasura la zona y se ejerce una ligera presión o se coloca una bandita elástica para ingurgitar la vena. La punción se hace con aguja o lanceta. Se obtienen pequeños volúmenes de sangre recogiendo las gotas en tubos eppendorf.

Venas y arterias caudales

Para pequeños volúmenes, sencillamente por amputación de la punta de la cola o un pequeño corte de las venas caudales, recolectando la sangre en tubos capilares heparinizados. Esta vía es utilizada como último recurso cuando no pueden o fallan las otras opciones.

Intracardiaca

Se pueden obtener grandes volúmenes de sangre directamente por punción cardíaca, utilizando diferentes técnicas. El animal debe estar previamente anestesiado. Se coloca en decúbito dorsal, se ubica la apófisis xifoides y se inserta la aguja perpendicularmente a la columna vertebral formando un ángulo de 45 °, igual que se realiza en el ratón. Si punzamos el corazón se aspira el émbolo y comienza a fluir la sangre. Las medidas de las agujas son de 20 a 25G. El volumen de sangre dependerá del peso corporal de la rata, generalmente se obtienen 3 ml en un animal adulto.

Cuando se quiere extraer sangre en forma periódica o seriada debemos tener en cuenta los volúmenes y el tiempo entre una extracción y otra, como así la vía por la cual podemos realizarla; igualmente como se explicó en el ratón. El volumen de sangre dependerá del peso de la rata, se puede sangrar el 1 % del peso corporal cada 2 semanas, el 3% del peso corporal una vez al mes y el 6 % es sangrado a blanco. Por ejemplo, para obtener un volumen del 1% del peso de una rata de 200 gr., sangramos hasta 2 ml, el 3% sangramos 6 ml y el 6% obtenemos hasta 12 ml.

Características anatómicas generales

Cabeza y cuerpo

La rata de laboratorio, se caracteriza por tener un cuerpo fusiforme. Están cubiertas de pelo por todo el cuerpo salvo la nariz, labios, pulpejos palmares y plantares y la cola. Además, en ciertas regiones encontramos pelos táctiles, alrededor del hocico, en las patas y sobre la cola. Es normal que presenten ojos prominentes, párpados desarrollados y unas finas y cortas pestañas. Dentro de los párpados encontramos las glándulas meobias, que junto con las secreciones de las glándulas lagrimales y las de Harden, sirven para lavar al ojo y ante un estrés producen porfirinas, pigmento de color rojizo que puede confundirse con sangre, El labio superior presenta un surco central y vertical, que llega hasta el inicio de la nariz. Poseen 5 dedos en las cuatro extremidades, con almohadillas interdigitales dos almohadillas basales.

En cuanto a su estructura esquelética la fórmula vertebral es C7- T13- L6- S4- C27-30. La osificación no es completa hasta el primer año de vida. El segmento dorsal de las costillas se osifica completamente, mientras que el ventral se calcifica no existiendo verdaderos cartílagos costales.

En el miembro anterior la escápula presenta una posición horizontal y el húmero es fácilmente identificable. En el miembro posterior tibia y el peroné están fusionados distalmente.

Los roedores no poseen glándulas sudoríparas y no pueden jadear, si tienen calor aumentan el volumen de agua ingerida y se esconden buscando sombra. Si no logran bajar su temperatura salivan copiosamente para mojar todo el cuerpo con sus patas. Estos animales se adaptan mejor al frío que al calor. Los neonatos no desarrollan los mecanismos termorreguladores

hasta finalizar la primera semana de vida, porque las reservas de glucógeno en ellos son pequeñas. La hipotermia produce una hipoglucemia que puede ser fatal.

Bazo

En forma de lengüeta se dispone a lo largo de la gran curvatura del estómago.

Hígado

Presenta cuatro o cinco grandes lóbulos: lóbulo medial; lóbulo lateral derecho: parcialmente dividido en un lóbulo craneal y otro caudal; lóbulo izquierdo: de gran tamaño y lóbulo caudal: pequeño. La rata no presenta vesícula biliar.

Páncreas

Es un órgano difuso que se extiende en la curvatura del duodeno.

Pulmones

El pulmón derecho presenta 3 lóbulos: craneal, medio y caudal. El pulmón izquierdo está formado por un único lóbulo.

Glándulas mamarias

6 pares de mamas (3 torácicas y 3 abdominales)

Referencias

- Benavides F.J. y Guénet J.L. (2003). Manual de Genética de Roedores de Laboratorio Universidad de Alcalá de Henares y la SECAL, España.
- CCAC Guide: Rats. Canadian Council on Animal Care, 2020 ISBN 978-0-919087-81-1
- Fox J., Barthold S., Davisson M., Newcomer C., Quimby A., (2006) The Mouse in Biomedical Research: Normative Biology, Husbandry, and Models. Volume3. American College of Laboratory Animal Medicine, *Volume (3)* 2nd Edition. USA
- Fox J., Davisson M., Barthold S., Newcomer C., Quimby A., (2007). The Mouse in Biomedical Research History, Wild Mice, and Genetics. *Volume (2)* i. American College of Laboratory Animal Medicine Book • Second Edition. USA.
- Green E. (1975). Biology of the laboratory mouse. 2nd ed. Dover Publications, New York. USA
- Lotus W. (2005). A primer on rodent identification methods *Laboratory Animal Volume (34)*, Nº. 4, 64-67.
- Morton B., Jennings S., Buckwell A., Ewbanck R., Godfrey C., Holgate B., Ingles R., James R., Page C., Sharman I., Verchosley R., Westall L. and Wilson A. (2002) Refinando los procedimientos para la administración de sustancias. *Laboratory Animas. SECAL. España.*

Resasco A., (2018). *Título:* Impacto del desarrollo de la línea tumoral A549 en el bienestar de ratones de la cepa NLAE:NIH (S)-*Fox1nu/nu*, Tesis doctoral repositorio de la Facultad de ciencias Veterinarias de Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Zúñiga JM., Orellana M. y Tur Marí J. (2015). Ciencia y Tecnología del Animal de Laboratorio Universidad de Alcalá de Henares - SECAL España.

CAPÍTULO 13

El hámster como animal de experimentación

Juan Martín Laborde

Origen

El hámster es un roedor de la familia Cricetidae, que en la naturaleza está ampliamente distribuido en el norte de África, partes de Europa, Medio Oriente, Rusia y hacia el este en China.

El hámster sirio o dorado (*Mesocricetus auratus*) es de esta especie la más utilizada en el laboratorio, aunque también se desarrollan estudios con el hámster chino (*Cricetulus griseus*) y el europeo o negro (*Cricetus cricetus*).

Los términos "hámster sirio" y "hámster dorado" son sinónimos en la literatura ya que la especie en estado silvestre tiene un pelaje corto de color de rojizo a marrón. Sin embargo, estos animales han sufrido varias mutaciones durante su domesticación, que, a través de la selección natural, ha resultado en una variedad de colores, longitudes y patrones de pelaje. Probablemente todos los hámsters domesticados son descendientes de aquellos capturados por el Dr. Adler en sus estudios sobre Leishmaniasis durante el año 1930 en Aleppo; Siria.

Taxonomía

Clase: Mamífera

Orden: Rodentia

Familia: Cricetidae

Género: *Mesocricetus*

Especie: *auratus*

Características biológicas

El hámster dorado o sirio puede medir de 13 a 18 cm de longitud y con un peso promedio de 100 gramos en el adulto.

El promedio de vida es entre 18- 24 meses, aunque existe información de ejemplares que llegaron a una longevidad de 36 meses. Es un animal pequeño de cola corta; la hembra es un poco más grande, más fuerte y más agresiva que el macho.

En los laterales de la cavidad bucal ambos sexos, poseen unas bolsas denominadas abazones, que están bien desarrollados, que están formados por tejido epitelial muy vascularizado y que les sirven para el transporte de alimentos, de material de nido cuando la hembra lo construye o para proteger a las crías a quienes guarda en esas bolsas o abazones ante determinadas situaciones de peligro.

En los flancos del cuerpo y a nivel dorsal presentan glándulas sebáceas modificadas (glándulas laterales) cuya secreción les sirven para marcar su territorio.

Otra característica de la especie es su orina que posee un pH de 8.0, es rica en cristales minerales y presenta una consistencia turbia y lechosa (Miedel y Hankenson, 2015).

Comportamiento

Esta especie, en la vida silvestre, hace una excavación en el suelo para la construcción de su nido y si tiene disponibilidad de alimento, realiza un gran acopio dentro del mismo. Otra característica del comportamiento del hámster es que cuando la temperatura comienza a descender por debajo de 15 °C y se acorta el fotoperiodo, puede entrar en estados cortos de hibernación. Durante los mismos el hámster entra en un profundo sueño durante el cual la temperatura corporal desciende de 37-38 °C a un grado o dos por encima de la temperatura ambiente y el ritmo respiratorio, de las 35-135 respiraciones con un metabolismo normal, también baja a aproximadamente a una o dos por minuto, mientras que los latidos del corazón caen a 4-15 / min desde un nivel normal de 250-500 / min (Miedel y Hankenson, 2015).

Usos en investigación

El hámster tiene características únicas que lo hacen adecuado como modelo animal para muchas investigaciones biomédicas. Los abazones o bolsas gutrales son especialmente adecuados para estudios sobre microcirculación y también para el trasplante de tejidos indiferenciados y neoplásicos. Su valor como sitio de trasplante es práctico por el hecho de que la bolsa gutular es accesible para la observación directa. Los dientes se han utilizado ampliamente en el estudio de caries dentales y enfermedades periodontales. Son susceptibles a la diabetes mellitus. Esta especie también se ha utilizado en una variedad de patologías e investigaciones de parasitología, estudios de hibernación, enfermedades infecciosas como leishmaniasis, sífilis, toxoplasmosis, lepra y micosis. También es un modelo animal para estudios de teratología debido a su corto período de gestación de 15-18 días, en contraposición a los 21 o más días de otras especies de roedores de laboratorio.

En la actualidad y después del brote inicial de la epidemia de SARS en Asia, se lo utiliza como modelo animal susceptible al coronavirus ya que reproduce muchos síntomas clínicos observados en humanos en la reciente aparición del SARS-CoV-2 en donde el ACE-2, que es el receptor de la célula huésped responsable de mediar la infección por SARS-CoV-2 en humanos, se encuentra también en los hámsters sirios y por lo tanto son susceptibles a la infección por lo que se lo utiliza en el estudio de la transmisión, diseminación viral intrahospitalaria, patología y en el desarrollo de vacunas y antivirales (Bowen, 2013; Miedel y Hankenson, 2015; Muñoz-Fontela y col., 2020).

Producción

Microambiente

El hámster se aloja en cajas de polipropileno, acero inoxidable o policarbonato con una altura mínima de 15 cm. En general las cajas y jaulas diseñadas para ratas se adecúan perfectamente para alojar a esta especie. Existen modelos que les permite a los animales ver el exterior, de esta manera pueden visualizar los movimientos del personal y se hacen más dóciles.

Se debe tener en consideración que el hámster roe el plástico, la madera e incluso los metales blandos y es posible que escapen de las jaulas que no son adecuadas. En una colonia de cría, la hembra debe alojarse en una caja opaca, con suficiente alimento, agua y lecho para permitir que al animal no se lo manipule por un período de al menos una semana después del parto. La superficie requerida para los animales de destete es de 650 cm², para los que tienen entre 5 semanas y tres meses de 810 cm², para aquellos de más de 3 meses debe ser de 970 cm² y una hembra con cría requiere 1100 cm². Como lecho se puede utilizar viruta u otros productos vegetales (cáscara de arroz, girasol y marlo de maíz triturado) el que se debe renovar, junto con la limpieza de la caja o jaula. una o dos veces por semana.

Estos animales son muy activos, principalmente durante el período de oscuridad ya que son de hábitos nocturnos, por lo que se aconseja proveer un mayor enriquecimiento ambiental especialmente durante la construcción del nido, por ejemplo, colocando materiales como madera, cartón o lana para tal fin.

Las cajas o jaulas deben limpiarse una o dos veces por semana. El hámster puede alimentarse con un concentrado comercial de buena calidad y administrado generalmente *ad-libitum*. Los requisitos nutricionales de estos roedores omnívoros son de un mínimo de 16% de proteínas en las raciones de mantenimiento para animales adultos; sin embargo, se requiere un nivel de 24% de estas o más, en las hembras en gestación para asegurar un crecimiento adecuado de las crías. Las raciones básicas pueden complementarse con frutas y verduras frescas una vez por semana las cuales deben lavarse en una solución de cloro de 400 ppm como precaución contra contaminaciones. Sin embargo, hay que cuidar la cantidad de alimentos frescos que

se ofrecen, ya que los animales prefieren estos a los pellets comerciales, con el riesgo de un desequilibrio en la ingesta de nutrientes. Se ha informado que algunas frutas, especialmente las manzanas, juegan un papel importante en la dieta del hámster, y que la eliminación de estos alimentos de su dieta a menudo dará lugar a una disminución en la tasa de implantación del óvulo y un aumento en el canibalismo.

El agua potable y fresca debe estar disponible en todo momento. El consumo de alimento estándar es de 7-15 g / día y el de agua de hasta 20 ml / día para animales que ingieren únicamente alimentos secos. Las crías empiezan a beber a los 10 días de edad, de manera que los bebederos deben situarse a una altura adecuada para que puedan alcanzarlos (Beaulieu y Reeb, 2009; Miedel y Hankenson, 2015).

Macroambiente

Esta especie puede, como la mayoría de los animales del desierto, adaptarse a considerables fluctuaciones de temperatura. Sin embargo, como las bajas temperaturas son uno de los factores que propician la hibernación, es aconsejable mantenerlos en salas a 22-24 °C durante todo el año. Otra de las variables ambientales más importantes en el hámster es la iluminación en donde lo ideal es un ciclo de 12 horas de luz / día para las hembras y 14 horas luz / día para los machos, ya que si son menores estos valores se produce un bloqueo de la secreción de gonadotrofinas hipofisarias, lo que se traduce en prolongados periodos de anestro y atrofia testicular respectivamente.

La humedad relativa debe oscilar entre 30 y 70 % en función de la temperatura corporal y la renovación del aire de la sala donde se alojan debe ser entre 10 y 15 recambios por hora. Al igual que en la mayoría de los animales de laboratorio, los ruidos deben controlarse para que no modifiquen su comportamiento normal (Miedel y Hankenson, 2015).

Programa reproductivo

Existen 3 sistemas reproductivos: reproducción monogámica, reproducción dirigida y reproducción poligámica.

1. **Reproducción monogámica:** consiste en el apareamiento de un macho y una hembra luego del destete. Las ventajas de este sistema incluyen una gran reducción de trabajo y un registro minucioso del rendimiento reproductivo de los animales y del pedigrí. Esta última característica es esencial cuando se mantienen cepas endocriadas. La mayor desventaja es el canibalismo que puede darse con las crías.
2. **Reproducción dirigida:** Es el método más exitoso de reproducción, aunque requiere de un trabajo más intensivo. El procedimiento más común es colocar a la hembra en la caja del macho y observar si ocurre la cópula. Si la hembra es receptiva se observa

lordosis y el apareamiento se produce inmediatamente (especialmente si se utiliza un macho experimentado), pero si comienzan a agredirse deben separarse lo más pronto posible, ya que la hembra puede llegar a lesionar al macho o incluso matarlo. El apareamiento dirigido requiere de la detección precisa del estro para que la hembra pueda ser colocada en la jaula del macho. Por lo general si la hembra está en celo, el macho la cubre casi de inmediato y luego debe retirarse la hembra, pero también es común que ocurra durante las horas de oscuridad, entonces un ciclo de luz inverso en la colonia de cría, permite la adaptación del sistema de apareamiento dirigido durante las horas de trabajo del personal y facilita el control de los animales.

3. **Reproducción poligámica:** Este método, si bien ha sido utilizado con éxito tiene la desventaja de ser estresante para los animales. Por lo general se agrupan de uno a cuatro machos con un gran número de hembras (1 a 5 veces superior a los machos) y luego las hembras deben separarse en forma individual antes del parto, se debe tener en cuenta que luego del mismo cuando regresan, por lo general ocurren agresiones entre los animales.

Las hembras alcanzan la madurez sexual al mes de edad, pero no se recomienda aparearlas hasta que tengan al menos seis semanas. Los apareamientos monogámicos son preferibles a los apareamientos poligámicos, debido a la tendencia de esta especie a la agresión cuando están alojados en grupos y, particularmente, entre las hembras, cuando hay diferencias temporales en la aparición del estro. En cambio, las parejas monogámicas, que permanecen juntas desde el destete y de por vida, han demostrado ser útiles y un sistema de cría seguro para cepas consanguíneas (Miedel y Hankenson, 2015).

Ciclo estral y ciclo de vida

En las hembras sexualmente maduras durante el estro se observa una secreción vaginal mucosa, translúcida, ligera, filante, que pasa a ser opaca, densa en el día siguiente, pero el mejor diagnóstico del estro lo constituye el comportamiento de no agresión frente al macho, así como la lordosis, incluso sin necesidad de contacto físico con aquel. El ciclo estral es de 4 días de duración, y luego del parto se produce un celo anovulatorio. El primer celo fértil, se produce entre los 4 a 8 días después del destete y durante el apareamiento la implantación del óvulo ocurre al sexto día después del acoplamiento.

La gestación tiene una duración de 16 días y el tamaño de la camada oscila entre 4 y 16 crías. Cuando la hembra está construyendo el nido previo al parto se recomienda colocar suficiente alimento como para no perturbarla durante los 10 días siguientes al nacimiento de las crías, así se reduce el canibalismo en caso de presentarse. Los recién nacidos tienen el conducto auditivo y los ojos cerrados, no tienen pelo y ya presentan dientes incisivos. Los oídos se abren a los 4 y 5 días, empiezan a ingerir alimento sólido entre los 7 y 10 días y abren los ojos entre los 14-16 días. Es importante que las crías dispongan de suficiente agua ya que comien-

zan a comer alimento sólido antes del destete que se realiza a los 21 días. Los animales alcanzan la pubertad a las 8-10 semanas, sin embargo, aunque existen animales precoces que a las 4 semanas pueden reproducirse, la edad ideal para el apareamiento es de 8-10 semanas en la hembra y 10-12 semanas en el macho.

La edad reproductiva es de 10 meses y durante este tiempo la hembra produce entre 4 a 6 camadas, según el sistema reproductivo que se implemente. Las hembras entrarán en estro el segundo o tercer día después del destete de sus crías. No presentan un estro posparto.

El canibalismo ocurre con bastante frecuencia, particularmente con las primeras camadas. Las hembras deben alojarse en cajas o jaulas con piso sólido, porque las que se crían con los pisos perforados, invariablemente devoran a sus crías. Los animales jóvenes pueden mantenerse juntos hasta la madurez, pero deben ser observados cuidadosamente para determinar si algún animal tiene tendencia a un comportamiento agresivo (Miedel y Hankenson, 2015).

Manejo

Identificación

Los animales se pueden identificar en forma individual mediante la marcación de las orejas utilizando muescas y orificios, con pequeñas caravanas o por tatuajes en la piel, excepto en aquellos animales con piel oscura.

Sujeción

El hámster es un animal solitario y en ciertas circunstancias es bastante agresivo con otros animales o con la persona que los manipula. Cuando el manejo es suave y las experiencias no implican dolor o situaciones de estrés, entonces el animal puede ser dócil y no morder al ser recogido y restringido manualmente. Para sujetarlos o levantarlos, es suficiente con introducirlo en un recipiente de pequeño tamaño, tomarlo por la piel laxa del cuello, o con ambas manos colocando los dedos alrededor del tórax, dorso y la cola. En ocasiones es necesario usar guantes para realizar estos procedimientos, pero hay que considerar que, una vez que un animal asocia una mano enguantada con un daño o incomodidad, en la siguiente oportunidad intentará morder. Todos los movimientos al acercarse al animal deben ser delicados y no repentinos. Los hámsteres cuando duermen ocasionalmente pueden manipularse, sin embargo, esto no es aconsejable, ya que el despertar repentino durante el proceso sorprenderá al animal y puede agredir

Sexado

Para identificar sexualmente a esta especie se procede a observar que en el macho el margen perineal es redondeado como consecuencia de la presencia del saco escrotal, mientras que la hembra presenta una forma puntiaguda. Otro rasgo distintivo es la mayor distancia ano-genital en el macho y la existencia de una papila más protuberante.

Vías de inoculación

Subcutánea

Esta vía de inoculación se realiza principalmente en la zona inguinal o inter escapular. La zona debe variarse si el procedimiento se realiza con frecuencia. La aguja debe avanzar paralelo al cuerpo a través de la piel. Debe moverse de lado a lado para asegurarse que no esté en la dermis o musculatura. La cantidad de inoculo es de 0,5 - 1,0 ml y se usa una aguja de 24 G (Gauges).

Intramuscular

El sitio de elección para esta técnica es el músculo posterior del fémur (músculos semitendinoso y semimembranoso). Se avanza con la aguja dentro del músculo y se administra el inoculo, previamente se lleva el embolo hacia atrás para observar si viene sangre y no estar dentro de un vaso sanguíneo. El volumen máximo es de 0,1 ml y con una aguja de medida 26 G.

Intraperitoneal

Esta inoculación se debe realizar en el cuadrante inferior de la región abdominal ligeramente desplazado de la línea media del cuerpo hacia uno de ambos costados. Se sujeta y posiciona el animal decúbito dorsal y desplazado ligeramente hacia craneal. La aguja ingresa paralela a la columna vertebral por vía subcutánea, se desliza 5 mm hacia craneal y luego se atraviesa la pared abdominal. El volumen máximo a inocular es hasta 1 ml.; el tamaño de la aguja debe ser de medida 25 G.

Intravenosa

Debido a los hámsteres un apéndice caudal corta, esa vía se realiza en las venas yugulares, vena sublingual (poco utilizada) o la vena lateral del tarso en la unión femorotibial y tibio tarsiana. Para ello se debe anestésiar al animal y luego se procede a dilatar la vena. La aguja de medida 27 G debe avanzar paralela a la vena con el bisel hacia arriba se debe corroborar que está en la misma mediante una pequeña aspiración con el embolo de la jeringa y si es correcto administrar el inoculo. El volumen máximo es de 0,3 ml.

Intragástrica

La inoculación gástrica es fácil de realizar en el hámster adulto, usando una sonda de 4-5 cm de longitud de medida 18 G. El animal debe sujetarse con el dedo pulgar y el índice alrededor de la región axilar del animal, con la palma de la mano dorsal al animal. La sonda debe colocarse en la boca y desplazarla suavemente a lo largo del paladar y luego hacia el esófago. Si encuentra resistencia entonces el procedimiento se debe realizar nuevamente. el animal reaccionará violentamente si la aguja está en posición. Otra forma de sujeción es tomando el animal con todos los dedos por la piel laxa del dorso. El volumen máximo a descargar es de 1,0 ml.

Colecta de sangre y muestras

Vena lateral del tarso

Para realizar este procedimiento se usa una aguja de medida 25 G sin la jeringa y se introduce en la vena, a la que previamente se la dilato por calor o presión. Cuando comienza a fluir la sangre se la puede recoger con un tubo de microhematocrito.

Punción cardíaca

En este procedimiento el animal debe estar anestesiado, se coloca en posición decúbito dorsal y usando una aguja de medida 23 G con una jeringa de 1 ml se introduce en el espacio entre la unión de la apófisis xifoidea y la última costilla en un ángulo de 30 °. La aguja debe avanzar hasta sentir el choque cardíaco. Se puede obtener hasta 1 ml. Ya que más de 3 ml causa la muerte del animal adulto.

Para muestras de orina y heces se puede utilizar una caja metabólica, se pueden usar las diseñadas para ratas.

Enfermedades infecciosas más prevalentes en el hámster

La enfermedad más común y frecuente por confinamiento es la llamada "cola húmeda". Esta es una enfermedad entérica que también es conocida como ileítis proliferativa, o hiperplasia ileal transmisible. Los signos clínicos que se observan son la de una enteritis severa, letargo, irritabilidad, anorexia, emaciación y finalmente la muerte entre las 48 horas y una semana de iniciados los mimos. Otra enfermedad prevalente en esta especie es la causada por infecciones con *Escherichia coli*, mientras que una bacteria intracelular similar a especies de *Campylobacter* puede estar involucrada en la producción de lesiones hiperplásicas. En las colonias de hámsters también son frecuentes las infecciones por *Clostridium piliforme*, los virus Sendai, parvovirus del hámster y de la Neumonía del Ratón que pueden derivar en el desarrollo de

neumonías. Un hámster con una afección respiratoria mostrará lordosis, exudados nasales y ocasionalmente temblores.

El virus de la Coriomeningitis linfocitaria es transmisible al ser humano, es una zoonosis por lo cual es importante que el diagnóstico de este virus se incluya en el control sanitario de estas colonias (Cassano y col., 2012; Brownstein, 2007).

Sensibilidad a los antibióticos

Esta especie es sensible a la toxicidad por antibióticos, en estas situaciones puede producir enterotoxemia como resultado del uso de penicilina, vancomicina y la eritromicina que se consideran tóxicas en diversos grados y están contraindicadas en el tratamiento de enfermedades bacterianas en el hámster (Miedel y Hankenson, 2015).

Referencias

- Beaulieu, A., Reeb, S.G., 2009. Effects of bedding material and running wheel surface on paw wounds in male and female Syrian hamsters. *Lab. Anim.* 43, 85–90.
- Cassano, A., Rasmussen, S., Wolf, F.R., 2012. Viral diseases. In: Suckow, M.A., Stevens, K.A., Wilson, R.P. (Eds.), *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents* Academic Press, Waltham, MA, pp. 821–837.
- Brownstein, D.G., 2007. Sendai virus and pneumonia virus of mice (MPNV), second ed. In: Fox, J.G., Barthold, S.W., Davisson, M.T., Newcomer, C.E., Quimby, F.W., Smith, A.L. (Eds.), *The Mouse in Biomedical Research*, vol. 2 Elsevier, New York, pp. 281–310.
- Bowen, W.H., 2013. Rodent model in caries research. *Odontology* 101, 9–14.
- Miedel EL, Hankenson 2015. FC. Biology and Diseases of Hamsters. *Laboratory Animal Medicine*; 209-245. doi:10.1016/B978-0-12-409527-4.00005-5
- Muñoz-Fontela, C., Dowling, W.E., Funnell, S.G.P. et al. Animal models for COVID-19. *Nature* 586, 509–515 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2787-6>

CAPÍTULO 14

El jerbo como animal de experimentación

Juan Martín Laborde

Origen

El Jerbo, Merión o Gérbil (*Meriones unguiculatus*) es un pequeño roedor que pertenece a la familia Muridae y es originario de las regiones desérticas (estepas áridas y desiertos) del noreste de China y Mongolia. El clima de estas áreas es marcadamente continental y se encuentra afectado por el Monzón de Verano. En invierno, las temperaturas pueden alcanzar desde -10 hasta +2 °C pero en verano pueden ser altas, fluctuando de 20 a 30 grados °C.

El promedio de lluvia anual es muy bajo (menor de 400 mm) ocasionando, eventualmente severas sequías (Musser y Carleton, 2005; Waiblinger, 2010).

Taxonomía

Clase: Mamífero

Orden: Rodentia

Familia: Muridae

Género: Meriones

Especie: unguiculatus

Biología general

El jerbo es una especie de hábitos crepusculares, que vive en su medio natural en grandes grupos familiares en complejos sistemas de galerías y túneles, excavados en el suelo arcilloso, arenoso y seco, donde construye sus nidos y cámaras de almacenamiento circulares, allí deposita las semillas de las gramíneas y ciperáceas de las cuales se alimenta (Batsaikhan y Tsytsulina, 2016; Waiblinger, 2010; Van Veen, 1999). Suelen frecuentar, ocasionalmente, las plantaciones de trigo y mijo, causando daños de consideración. Hay 14 especies en el género Meriones y es preciso realizar revisiones concisas en cuanto a su origen, historia natural, hábitat y comportamiento y como también el desarrollo como animal de laboratorio. La capacidad del jerbo para

conservar el agua es única entre los animales de laboratorio, su ingesta media es de sólo 4 ml / día. Del mismo modo, elimina sólo unas pocas gotas de orina al día, lo que, en parte, explica su relativa falta de olor cuando se cría en cautiverio. El jerbo puede, si es necesario, satisfacer sus requerimientos de agua durante periodos considerables de tiempo con la que obtiene a partir de vegetales frescos. Sin embargo, esta no es una forma aceptable de satisfacer las necesidades de agua de estos animales en condiciones de laboratorio por lo cual hay que suministrársela en bebederos. Esta especie tiene gran capacidad termorreguladora y presenta una temperatura crítica de 30 grados °C con un rango de neutralidad térmica que se extiende hasta los 40 °C, lo que le permite tolerar, incluso las radiaciones solares directas en las horas más calurosas del día (Musser y Carleton, 2005; Waiblinger, 2010).

La longitud de la cabeza y el cuerpo es de 95-180 mm, y la longitud de la cola es de 100-193 mm. El peso medio es de 50-55 gr para las hembras y 60-100 gr para los machos. La cobertura del pelaje en la cola es corta cerca de la base y progresivamente más largo hacia la punta donde se torna ligeramente espesa. Los jerbos o meriones tienen varios colores de capa. El color del pelaje salvaje es agutí y está controlado por un gen dominante autosómico. El color arena tienen un gen de color recesivo y muestran un color amarillo jengibre en el dorso y el vientre blanco crema típica de un jerbo de tipo silvestre. El pelo amarillo dorsal tiene la extremidad negra corta y una base amarronada verde clara a verde oliva. Se puede distinguir una clara línea de demarcación entre el color de la parte dorsal y ventral. En cautiverio se ha logrado producir animales albinos y con pelaje de colores oscuros detectándose en los jerbos negros un gen autosómico recesivo; los albinos (con los ojos rojos debido a su condición genética) también tienen un gen autosomal recesivo (Garbers y col., 2015).

Los jerbos tienen una gran glándula abdominal ventral que depende de la actividad de las hormonas andrógenas. Logra un mayor tamaño en los machos y se desarrolla a una edad más temprana. La glándula se utiliza para marcar el territorio. Se ha comprobado que las hembras marcan su territorio después del parto y se vuelven más agresivas (Musser y Carleton, 2005).

La corteza adrenal de estos animales produce cantidades casi iguales de corticosterona y 19-hidrocorticosterona. Cuando se compara el peso de esta glándula con el peso corporal, se verifica que la glándula suprarrenal es casi 3 veces mayor en jerbos que en las ratas. Esta especie tiene una alta proporción de glóbulos rojos con policromasia, marcado número de basófilos y reticulocitos. Presentan índices de colesterol alto en el suero y lipemia al consumir dietas estándar de roedores con el 1% de colesterol añadido, esto puede provocar el desarrollo de lipidosis hepática (síndrome de hígado graso) y formación de cálculos biliares, pero no de aterosclerosis (Li y col., 2016).

Comportamiento

El jerbo vive en grandes grupos o comunidades, debido a que, por lo común, las camadas destetadas no abandonan el grupo familiar. Lo mismo puede ocurrir en cautiverio si se decide

mantener con los padres a las camadas sucesivas, lográndose una perfecta armonía en el grupo parental (Batsaikhan y Tsytsulina, 2016; Van Veen, 1999).

La especie no vocaliza, al menos en el rango audible humano, el tamborileo con los miembros puede constituir un mecanismo significativo de comunicación o alerta. La socialización y marcación del territorio parece depender, básicamente, del olfato. Para esto, ambos sexos poseen grandes glándulas sebáceas en la piel ventral, cercanas al ombligo ya mencionadas anteriormente que utilizan para marcar su zona (Kobayasi y Riquimaroux, 2012).

Cuando al animal se lo somete a algún estrés en el laboratorio, aún por causas simples como manipulación o cambio de caja, puede desarrollar convulsiones epileptiformes espontáneas, que ocurren en ciertas líneas genéticas con alta incidencia, mientras que esencialmente están ausentes de otras, esto se debe a un gen recesivo. La ocurrencia es en respuesta a la percepción de una amenaza, particularmente cuando está en un ambiente desconocido. La recuperación es espontánea, sin efectos nocivos y las convulsiones no son causa de alarma (Buckmaster, 2006).

El mal manejo y manipulación inadecuada de los animales en el laboratorio puede inducir a los individuos a la costumbre de morder a los cuidadores. Casi instintivamente, los adultos que se mantienen en cajas separadas suelen combatir furiosamente cuando se los junta, esto se hace extensivo al momento del primer apareamiento, entre machos y hembras, donde, generalmente, el macho suele salir derrotado y muchas veces muerto. Lo anterior puede evitarse alojando juntos grupos de animales prepúberes.

Sexualmente, los machos persiguen activamente a las hembras y muestran un patrón, con servicios repetidos, luego de lo cual proceden a la limpieza del prepucio. La hembra muestra una leve lordosis en el apareamiento. El macho juega un papel bastante activo en el cuidado parental y ambos sexos pasan mucho tiempo construyendo el nido y abriendo madrigueras.

Algunas otras características notables de esta especie son:

- a) la monogamia: normalmente se aparean entre las 10 y 12 semanas de edad, poco después del destete, y la pareja permanece junta durante toda la vida;
- b) disposición amistosa: con poca agresividad entre individuos.
- c) adaptabilidad a la temperatura: no muestran molestias entre 0-32 °C (32-90 °F) y pueden adaptarse adecuadamente a temperaturas considerablemente mayores pero teniendo en cuenta que deben contar con un lecho adecuado, buena alimentación y ventilación.

Los jerbos tienen una actividad cíclica que consiste en breves períodos de actividad intensa alternando con breves períodos de descanso o sueño profundo (Batsaikhan y Tsytsulina, 2016; Waiblinger, 2010; Van Veen, 1999)

Usos en el laboratorio

El jerbo ha sido utilizado para una amplia variedad de estudios de endo y ectoparásitos, bacteriológicos y virológicos. La especie es particularmente sensible a *Brusela abortus*, *Leptos-*

pira icterohaemorrhagiae y *Leptospira canicola*. La posibilidad de que tales enfermedades puedan manifestarse espontáneamente en los jerbos, debido a la contaminación del alimento, el agua y cama, o por contacto con otros roedores infectados, debe tenerse siempre en cuenta. Desde que se introdujeron en Norteamérica y se estableció la primera colonia comercial estos animales se han utilizado cada vez más en laboratorios de investigación. Este ha demostrado ser un animal particularmente útil en estudios de radiación y aterosclerosis experimental. Los efectos de las hormonas en las glándulas sebáceas (la almohadilla de la glándula sebácea abdominal en el jerbo es dependiente de andrógenos y fácilmente observable) y la capacidad del merión para la regulación de la temperatura son ejemplos de características que hacen que estos animales se adapten a determinadas áreas de investigación. Cabe mencionar que, aunque varias especies de jerbo han sido utilizadas como animales experimentales en estudios biomédicos, el más comúnmente utilizado es el gérbil de Mongolia (Batsaikhan y Tsytsulina, 2016; Waiblinger, 2010; Van Veen, 1999).

Producción

Macroambiente

El rango óptimo de temperatura oscila entre los 20 - 25 °C y la humedad relativa entre el 50% y el 60%.

El merión es una especie muy sensible, se deben evitar todos los factores que originan stress a la colonia, por lo que se deben evitar los ruidos.

Como son animales que producen poca orina, se recomiendan entre 7 y 8 recambios de aire por hora.

En cuanto al ciclo de luz no se diferencia al de las otras especies, es de 12 horas luz y 12 horas oscuridad (Van Veen, 1999).

Microambiente

Las cajas o jaulas, que se emplean habitualmente para ratas son los alojamientos más usados para estos animales. El espacio adecuado por animal es de 125 cm². La cama o lecho ideal es de viruta de madera, lo más fina y suave posible, ya que si se usa viruta gruesa los animales se lesionan o estresan. La cama debe esterilizarse a 120 °C durante 20 minutos por medio de autoclave. Se recomienda que los cambios y limpieza de cajas, tapas, separadores, biberones frascos, pipetas y tapones, debe efectuarse una vez por semana a intervalos regulares. El alimento se suministra *ad-libitum* (Eva Waiblinger 2016; Crittery Exotics, 2020). En su hábitat natural el gérbil consume poca cantidad de agua, pero, en confinamiento, debe proporcionársela fresca y en abundancia. Esté animal consume de 5 a 10 gr. de alimento en forma de

pellet o estrusado y 4 ml. de agua por día. La dieta del merión en estado natural consiste en vegetales verdes, raíces, semillas de bulbo, cereales, frutas e insectos. Acostumbran a acumular alimentos y no son coprófagos, a menos que las dietas carezcan de un valor nutritivo adecuado. La dieta comercial disponible debe contar con 18% -20% de proteínas y pueden tener problemas de deficiencia cuando se alimentan principalmente con dietas caseras, semillas de girasol y otras que carecen de nutrientes específicos. Las semillas de girasol son altas en grasa y baja en calcio. Se recomienda la comida en pellets (5 g / día) para evitar la obesidad. Los jerbos desarrollarán altas concentraciones de colesterol en la sangre si se los alimenta con dietas que contengan > 4% de grasa. Esto se manifiesta como lipemia que es más pronunciada en los machos.

Debido a que los jerbos son extraordinariamente aficionados a las semillas de girasol, y se les comen a exclusión de todos los demás alimentos esta característica se ha usado en investigaciones sobre comportamiento cuando se requieren pruebas motivadas por alimentos.

Los jerbos excretan poca orina, y los pellets fecales son duros y secos. Cuando la humedad es más del 50% el pelaje de los jerbos, en lugar de estar suave y lustroso aparece enmarañado e hirsuto. Esto parece ser su única reacción a la elevada humedad y por lo tanto debe considerarse como un bioindicador ambiental, sin significar en sí mismo una causa de alarma. Si el material de cama es adecuado y está disponible esta especie construye nidos cubiertos, independientemente de si la hembra está gestando o no. Su instinto es esconderse en un sitio oscuro y dormir mucho durante el día lo cual se facilita si cuenta con un nido.

Sus jaulas requieren una limpieza menos frecuente que en otros roedores de laboratorio. El merión se adapta a una amplia gama de temperaturas ambientales. Debido a que es propenso a desarrollar irritación nasal en ambientes con una humedad relativa de > 50%, es recomendable controlarla para mantenerla en los valores adecuados.

En la naturaleza los jerbos requieren de un “baño la arena” (similar a revolcarse en la misma) esto los ayuda a mantener baja la acumulación de tejido graso, en cautiverio se les puede proporcionar algún material inerte para que desarrolle este comportamiento. Los lípidos tienen dos fuentes: excreciones nasales de la glándula Harderiana que se eliminan cuando se acicalan usando los miembros anteriores y si disponen mediante frotación con la arena y los exudados sebáceos de la piel. Los beneficios de la eliminación de lípidos por el baño de arena son múltiples; no sólo limpia el pelaje, sino que también deposita lípidos en el sustrato que actúan como señales olfativas. El baño de arena dura aproximadamente 5 minutos. Además, tiene efectos homeostáticos. También se ha observado una adaptación genética al ambiente que hace que el color del pelo se aclare paulatinamente en jerbos agutí que tienen acceso al baño de arena. Cuando esta actividad no está presente, la acumulación de lípidos en el pelaje aumenta y el comportamiento cambia desfavorablemente. Los jerbos privados de arena aumentan su frecuencia de realizar una actividad de rodar de costado o de espalda y regresar a la posición inicial en pocos segundos, como también disminuyen el aseo, acicalamiento y aumentan el marcaje territorial (especialmente los machos).

Los jerbos a menudo adoptan la postura de estar erguidos en sus miembros posteriores, por lo que es importante que las jaulas tengan un fondo sólido y que la altura de la base hasta a la tapa sea lo suficientemente alta como para permitir este comportamiento (Batsaikhan y Tsytulina, 2016; Musser y Carleton, 2005; Van Veen, 1999; Waiblinger, 2010).

Programa reproductivo

Debe establecerse antes de que alcancen la madurez sexual, aunque pueden alojarse en grupos poligámicos, no es lo indicado. Las parejas monogámicas deben establecerse antes de las 8 semanas de edad, o incluso antes, sin que se produzcan agresiones o un claro rechazo sexual entre ellos. La reproducción puede iniciarse a las 10-12 semanas de edad cuando los animales tienen un peso de 70 a 80 gramos.

Al ser monógamos si uno de los miembros pierde su pareja por cualquier razón, no vuelve a aceptar otro ejemplar debido a que es una característica de su comportamiento. El macho ayuda en el cuidado de las crías. Las camadas son en promedio de 4 a 6 crías. Si son poco numerosas a menudo la madre las descuida; sin embargo, el canibalismo no sucede frecuentemente. Los animales de destete pueden ser sexados en cualquier momento después del nacimiento en base a la distancia anogenital, que es aproximadamente el doble en el macho que en la hembra. (Musser y Carleton, 2005; Van Veen, 1999; Waiblinger, 2010).

Ciclo estral

Las hembras de merión o jerbo son poliéstricas continuas, presentan un ciclo estral cada 4-6 días. A los dos o tres días después del parto tienen un estro 60 a 86 % fértil. El estro dura de 12 a 15 horas y se produce generalmente en horas crepusculares. Las hembras de madurez temprana tienen más probabilidades de reproducirse con éxito en el primer apareamiento y la fecundidad de por vida de las mismas es más del doble que la de sus compañeras de camada de maduración tardía. Dos terceras partes de las hembras de madurez temprana que no se reproducen después de un primer apareamiento quedarán preñadas después de un segundo apareamiento, pero sólo el 10% de las hembras de maduración tardía lo hacen.

El periodo de gestación oscila de los 24 a los 26 días. Durante el mismo la hembra aumenta 10 a 30 gr. En el caso de que el macho cubra a la hembra en el estro post parto, la implantación de los embriones se retarda 3 o 4 días, por lo que el periodo de gestación se alarga hasta los 30 días.

Los partos se producen generalmente de noche, las madres comen las placentas y dejan morir a las crías más débiles o defectuosas, pero raramente se produce el canibalismo.

El destete se realiza generalmente a los 21 días de edad.

La pseudogestación es ciertamente rara en esta especie, cuando se produce puede durar entre 10 a 15 días.

Los jerbos nacen con un peso de 2,5 a 3,5 gr. con los ojos y oídos cerrados y sin pelo. Entre el 5to y 7mo. día comienza a notarse el pelo. La erupción de los incisivos se presenta a los 12 días, los ojos y oídos se abren a los 16 días y es cuando comienzan a comer y beber. A los 21 días se destetan con un peso de aproximadamente 15 a 20 gr. (dependiendo del número de la camada). El descenso de los testículos se produce entre los 30 y 40 días, y la vagina se abre entre los 40 y 60 días. La madurez sexual ocurre entre los 63 y 84 días. La longevidad de un merión es de 2-3 años (Musser y Carleton, 2005; Van Veen, 1999; Waiblinger, 2010).

Manejo

Los jerbos se pueden manejar con bastante libertad y normalmente no hay peligro de mordeduras como también muy poca dificultad en el manejo de hembras preñadas, con camadas jóvenes o recién nacidos. Una forma corriente de sujetar al merión es por la base de la cola, pero se corre el peligro de desprender la piel a lo largo de la misma, sin embargo, es mucho más seguro sujetarlo extendiendo la mano sobre su dorso de manera que dos dedos estén sobre el cuello, con el pulgar y el tercer dedo debajo del vientre. Se debe tener cuidado de mantener una sujeción suave pero firme, ya que el jerbo es muy ágil y puede moverse con bastante facilidad y por lo tanto caer o escapar. Los procedimientos para la recolección de sangre, orina y muestras fecales son esencialmente los mismos que los descritos para otros roedores de laboratorio como el ratón, la rata y el hámster, con excepción del uso de las venas caudales que debido a tener la cola cubierta de pelo no son accesibles (Waiblinger, 2010).

Recomendaciones para el cuidado de la salud

El merión generalmente presenta muy pocos problemas de salud. Una condición que se encuentra comúnmente en estos animales es un crecimiento excesivo de los incisivos que resulta de una mala alineación o rotura de los dientes. Una pérdida localizada del pelo, particularmente sobre el dorso de la cola, se asocia a veces con el hacinamiento donde los animales comienzan a morder y recortar el pelo entre sí. Este hábito puede conducir a peleas, en cuyo caso la alopecia resultante se combinará con lesiones y abrasiones. También se puede observar otro tipo de alopecia, en el que hay una ligera inflamación de la piel en las fosas nasales externas debido a infecciones por *Staphylococcus aureus*, pero es poco frecuente y puede tratarse con una terapia antibacteriana local.

Un signo generalizado de malas condiciones sanitarias es la pérdida de peso, maloclusión de los incisivos y neoplasias. Una pérdida de peso rápida y severa será el resultado de la privación de alimentos y agua, aunque esto no debería ser un problema en una instalación de

animales de investigación y/o producción. Una capa de pelo áspero, hirsuto y grasoso puede indicar agresiones, desnutrición o enfermedad incipiente, aunque también se debe observar que la humedad relativa no supere el 50%.

Las zoonosis rara vez se ven en los jerbos y los únicos riesgos a este respecto parecen ser las infestaciones por *Hymenolepis sp.* e infecciones por *Salmonella sp* ya que tienen una susceptibilidad natural a la infección aguda en esta especie. Los jerbos son notablemente resistentes a las enfermedades infecciosas, particularmente a diversas infecciones respiratorias, como neumonía y otitis media, que también afectan a la mayoría de los roedores. Es posible que esto sea, al menos en parte, atribuible a su historia relativamente corta y uso limitado como animales de experimentación; parece, sin embargo, ser más probable debido a su resistencia innata. Los pocos informes de infecciones sistémicas en estos animales se refieren principalmente a enfermedades gastrointestinales. La enfermedad de Tyzzer, causada por *Clostridium piliforme*, afecta a los jerbos y es quizás causa frecuente de diarrea en los mismos.

Los parásitos intestinales incluyen a *Hymenolepis nana*. Pocas veces se observan infecciones de origen natural con ectoparásitos, aunque es posible una infección cruzada de otras especies de roedores de laboratorio con *Entamoeba muris* y *Enterobius vermicularis*.

Los jerbos viven durante tres y cuatro años y se ha descrito que se producen neoplasias espontáneas con una frecuencia creciente en animales adultos. Se han descrito neoplasias malignas de ovarios, glándulas sebáceas ventrales, riñón, glándulas suprarrenales y piel. La alta incidencia de tumores que se pueden esperar en el merión ocurre aproximadamente después de los dos años de edad y los hace inadecuados para estudios de toxicidad crónica.

Durante un control sanitario y de comportamiento debe tenerse en cuenta el aspecto general y la conducta del merión, particularmente en relación con los integrantes de la caja de alojamiento. Los animales enfermos a menudo están aislados de otros y pueden demostrar pérdida de peso, postura encorvada, letargo, pelaje áspero, respiración dificultosa y pérdida del comportamiento exploratorio. Los primeros signos de la enfermedad implican cambios en el color, la consistencia, el olor y la cantidad de orina y heces. El área perineal debe revisarse para detectar manchas o excretas fecales u orina en la vulva en las hembras. Se pueden tomar muestras de heces para la detección de parásitos y cultivo bacteriano. La piel y pelaje deben ser examinados por si se observa alopecia, heridas de peleas o de otro trauma, ectoparásitos, y para evidenciar si existe deshidratación. La cavidad oral debe explorarse para ver si hay dientes demasiado largos. Las orejas y los ojos deben examinarse para comprobar si hay exudados o inflamación. En los miembros pueden encontrarse llagas y uñas rotas. El abdomen debe palparse para detectar inflamaciones y lesiones. La temperatura corporal normal es de 37 ° -39 ° C. Se debe anotar la frecuencia respiratoria o signos de dificultad respiratoria. Se puede auscultar con un estetoscopio pediátrico. Durante las observaciones debe recordarse que la cola del merión es frágil y sólo se debe sujetar la base de la cola durante el manejo para evitar lesiones.

Dentro de las enfermedades infecciosas del merión podemos encontrar infecciones bacterianas, por *Mycoplasma* y por *Rickettsias*.

Es posible observar "eczema facial", "nariz adolorida" y dermatitis nasal las que describen una condición común de la piel de los jerbos. Las lesiones clínicas próximas a las fosas nasales externas aparecen inicialmente eritematosas, progresan hacia alopecia localizada y se convierten en una extensa dermatitis húmeda. Se cree que la causa es el aumento de la secreción de las glándulas Harderianas de las porfirinas (similar a la cromodacryorrea en las ratas), que actúan como un agente irritante primario de la piel. Varias especies estafilocócicas (*Staphylococcus aureus* y *S. xylosus*) pueden actuar sinérgicamente para producir la dermatitis. Factores de estrés tales como humedad ambiental > 50% o sobrepoblación causan secreción excesiva de glándula Harderiana. La infección por dermatitis nasal puede extenderse hasta los senos maxilares. Es común que los animales afectados desarrollen anorexia, dejan de beber, pierden peso y mueren. La distribución y la naturaleza de las lesiones son útiles en el diagnóstico. Las porfirinas acumuladas son fluorescentes bajo luz ultravioleta (lámpara de Wood). A través de estudios bacteriológicos de rutina se pueden aislar estafilococos patógenos. El tratamiento incluye la limpieza cuidadosa de las lesiones cutáneas y el uso tópico (ungüento oftalmológico al 1% de cloranfenicol) o antibióticos parenterales (excepto la estreptomina, que es fatal y contraindicada en los jerbos). La prevención requiere la reducción de la humedad ambiental por debajo del 40%, la reducción de los factores de estrés como el hacinamiento o la privación de arena.

La enfermedad de Tyzzer de origen natural, es una enfermedad enterohepática causada por la bacteria intracelular *Clostridium piliforme* y es la enfermedad infecciosa mortal más frecuentemente descrita de los jerbos. Los hallazgos clínicos y patológicos más comunes son muerte súbita o muerte después de un corto período de enfermedad y la presencia de múltiples focos de necrosis hepática. La diarrea y las lesiones necróticas en el tracto intestinal están presentes de forma variable. La forma probable de infección en la infección natural es la vía oral, porque los jerbos expuestos a una cama o lecho infectado con el agente etiológico contraerán la enfermedad de Tyzzer. Se recomienda administrar fluidos de apoyo y tratamiento profiláctico con doxiciclina (5 mg / kg durante 7-10 días) o metronidazol (20 mg / kg durante 7-10 días) para reducir la mortalidad en la colonia. Debido a que las bacterias forman esporas, el ambiente del bioterio debe ser completamente desinfectado.

El gérbil de Mongolia es susceptible a la infección por *Helicobacter pylori*, que causa gastritis severa, ulceración gástrica, y metaplasia intestinal. El adenocarcinoma gástrico se desarrolla en aproximadamente un tercio de los gérbil infectados mayores de 15 meses de edad. La enterotoxemia fatal debido a *Clostridium difficile* se ha asociado con el tratamiento con píldoras de tres antibióticos balanceados (que contienen amoxicilina, metronidazol y bismuto) para eliminar las infecciones de *Helicobacter* de origen natural, donde los animales afectados mueren dentro de los 7 días posteriores al tratamiento por antibióticos.

En relación a infecciones virales, no se conocen infecciones virales de origen natural en jerbos. Mientras que se conocen muchas infecciones parasitarias que afectan a estos animales, como la producida por *Syphacia obvelata*, y *Dentostomella* que se han observado en gérbil mongoles. Las infecciones con *Hymenolepis diminuta* y *Rodentolepis* (anteriormente *Hymeno-*

lepis nana), se han informado en jerbos utilizados como mascotas. La deshidratación y la diarrea mucoide suelen ser signos patognomónicos. *R. nana* tiene un ciclo de vida directo y potencialmente puede infectar a las personas a través de la vía oral. El tratamiento recomendado es niclosamida alimentada a 10 mg de alimento / 100 g de peso corporal durante dos períodos de 7 días separados por 1 semana. También son eficaces el tiabendazol (0,33% mezclado en el alimento durante 7-14 días) o praziquantel (5-10 mg / kg con repetición de dosis a los 10 días).

En jerbos mantenidos como mascotas se han observado infecciones con el ácaro *Ornithonyssus bacoti*.

No se conoce información sobre infecciones fúngicas dermatofitas naturales o experimentales en jerbos.

Existen informes sobre trastornos metabólicos y nutricionales en esta especie y también el desarrollo de enfermedad periodontal espontánea e insidiosa después de alimentarlos durante 6 meses con dietas estándar de ratón/rata de laboratorio. Con esas dietas el 10% de los animales pueden desarrollar obesidad y alguna disminución de la tolerancia a la glucosa, aumento de la insulina inmunorreactiva en suero, cambios en el páncreas y otros órganos.

Se han informado casos de condiciones iatrogénicas con un síndrome fatal de toxicidad aguda que se produce en los jerbos después de inocular una combinación de penicilina-dihidroestreptomicina-procaína. La toxicidad se debe a la dihidroestreptomicina, con 50 mg se produce casi 100% de mortalidad en los animales adultos. Aproximadamente 20% -40% de los jerbos desarrollan convulsiones reflejas, estereotipadas, epileptiformes (clónicas-tónicas) a los 2 meses de edad, también cuando son capturados o en respuesta a la estimulación sensorial y al comportamiento exploratorio forzado, pero la incidencia y severidad de sus convulsiones son variables; las convulsiones suelen pasar en pocos minutos, y no tienen efectos duraderos. Aunque la incidencia y gravedad de las convulsiones a menudo disminuyen con la edad, ciertos subgrupos de jerbos adultos no mejoran con el tiempo y progresivamente se vuelven más severos. La susceptibilidad se observa con frecuencia en líneas criadas selectivamente. Las convulsiones pueden ser suprimidas en jerbos genéticamente predispuestos si son frecuentemente estimuladas por el manejo durante las primeras 3 semanas de vida, aunque la terapia anticonvulsiva es innecesaria.

Los ovarios quísticos se presentan con frecuencia en los jerbos. Los quistes varían en tamaño desde 1-50 mm de diámetro y de realizarse la extirpación de uno de los ovarios afectados no afecta significativamente el rendimiento reproductivo.

Las hembras con un ovario son inferiores en fertilidad en comparación con las hembras normales; una disminución general de la fertilidad puede ser evidente en las hembras de edad avanzada. También se han informado neoplasias espontáneas en colonias de jerbos de Mongolia. Una incidencia de 25% -40% de neoplasia en los animales suele ocurrir después de 2-3 años de edad. El carcinoma de células escamosas de la glándula sebácea ventral en machos y el tumor de células de la granulosa ovárica en las hembras representan el 80% de los tumores observados en animales mayores de 3 años. Los tumores de la glándula ventral invaden localmente y pueden producir metástasis en los ganglios linfáticos

y pulmón. Los tumores adrenocorticales, el carcinoma cutáneo de células escamosas, el melanoma maligno y los hemangiomas renales y esplénicos siguen en incidencia. Se han descrito también otros tumores, incluyendo adenocarcinoma duodenal y cecal, linfagioma hepático, hemangioma y colangiocarcinoma, hemangioma esplénico y renal, leiomioma uterino y hemangiopericitoma, teratoma ovárico, teratoma testicular y melanoma maligno. Sin embargo, la incidencia total de estos fue de <5%.

También se conocen trastornos congénitos como la cardiopatía septal ventricular que se observa en jerbos recién nacidos. Trastornos relacionados con la edad donde además de neoplasia, hubo una alta incidencia de glomerulonefropatía crónica y degeneración miocárdica focal y fibrosis, especialmente en animales viejos. Los jerbos tienen una propensión notable para el desarrollo del colesteatoma auditivo. Se producen en el 50% de los jerbos de mayores de 2 años de edad. Los colesteatomas en el canal auditivo desplazan el tímpano hacia el oído medio. La compresión y la infección secundaria producen necrosis ósea y destrucción del oído interno. Los signos clínicos incluyen entre otros, la inclinación de la cabeza.

No hay informes específicos de enfermedades zoonóticas transmitidas por jerbos, aunque los jerbos mantenidos como mascotas infectadas con *Ornithonyssus sylviarum* y *Dermanyssus gallinae* han sido la fuente de dermatitis por ácaros aviares en niños. La infestación de ácaros aviares es una causa rara de dermatitis pruriginosa en las personas. Los ácaros pasan la mayor parte de su ciclo de vida en el hospedador aviar, pero pueden transmitirse a las personas por contacto directo o indirecto. La escasez de informes puede ser un verdadero reflejo de la ausencia de enfermedades zoonóticas en los jerbos (Thomas y col., 2015; Musser y Carleton, 2005; Van Veen, 1999; Waiblinger, 2010; IUCN Red List of Threatened Species, 2019).

Sexado

Los machos jóvenes tienen el escroto de color oscuro y una distancia ano genital (10 mm) mayor que las hembras (5 mm). Ambos sexos presentan papilas genitales.

Vías de inoculación

Las vías de inoculación son las mismas que se utilizan que para rata y ratón. En la siguiente tabla se indican las vías de inoculación, volumen del inóculo, lugar anatómico de inoculación y calibre de la aguja.

Vía	Volumen	Sitio de inoculación	Calibre de la aguja (Gauge)
Oral	1-5 ml	Estomago	22 G sonda gástrica roma
Intradérmica	0,1 ml	piel depilada del dorso	26 G
Subcutánea	0,5 – 1 ml	piel laxa del dorso	25 G
Intramuscular	0,05 ml	muslo posterior	26 G
Intraperitoneal	1 ml	Región ventral caudal izquierda	25 G
Intravenosa	0.2 ml	Venas caudales	27 G

Anestesia y Eutanasia

Un nivel de anestesia suficiente para la mayoría de los procedimientos de manipulación y cirugía menor se pueden lograr fácilmente inyectando ketamina a 40-45 mg / kg, i.m. o diazepam 5 a 10 mg / kg. Los anestésicos inyectables sufren una degradación metabólica muy rápida en roedores pequeños. En consecuencia, la anestesia quirúrgica con estos agentes requiere dosis relativamente altas con un aumento concomitante en el riesgo. El procedimiento más seguro y menos complicado es la anestesia inhalatoria por inducción con isoflurano, seguido de mantenimiento, usando una máscara y el mismo anestésico (Flecknell y col., 1983).

Referencias

- Batsaikhan, N. & Tsytsulina, K. (2016). *Meriones unguiculatus* (errata version published in 2017). The IUCN Red List of Threatened Species 2016. doi:10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T13171A22432999.en
- Buckmaster, Paul S. (2006). "Inherited Epilepsy in Mongolian Gerbils". *Models of Seizures and Epilepsy*. pp. 273–294. doi:10.1016/b978-012088554-1/50023-2. ISBN 978-0-12-088554-1.
- Comfortable Quarters for Gerbils in Research Institutions – Eva Waiblinger, *Animal Behavior*, Zoological Institute, University of Zürich, Switzerland". Archived from the original on 2016-04-02.
- Flecknell, P, John, M; Mitchell, M & Shurey, C. *Injectable Anaesthetic Techniques In 2 Species Of Gerbil (Meriones lihyucus And Meriones unguiculatus) Laboratory Animals (1983) 17, 118-122.*
- Garbers C, Henke J, Leibold C, Wachtler T, Thurley K. Contextual processing of brightness and color in Mongolian gerbils. *J Vis.* 2015; 15(1):15.1.13. [PubMed] [Google Scholar]

- Kobayasi KI, Riquimaroux H. Classification of vocalizations in the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *J Acoust Soc Am*. 2012; 131(2):1622–31. [PubMed] [Google Scholar]
- Li, Xiaohong; Lu, Jing; Wang, Ying; Huo, Xueyun; Li, Zhenkun; Zhang, Shuangyue; Li, Changlong; Guo, Meng; Du, Xiaoyan; Chen, Zhenwen; Bader, Michael (18 July 2016). "Establishment and Characterization of a Newly Established Diabetic Gerbil Line" *PLOS ONE*. 11 (7):e0159420. Bibcode: 2016 PLoSO. 1159420L. doi:10.1371/journal.pone.0159420. PMC 4948894. PMID 27427908. Mongolian Gerbils - Split-caging". *Crittory Exotics*. Retrieved 2020-10-02. Musser, G.G.; Carleton, M.D. (2005). Superfamily Muroidea. In Wilson, D.E.; Reeder, D.M (eds). *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference* (3rd ed.). Johns Hopkins University Press. p. 1239. ISBN 978-0-8018-8221-0. OCLC 62265494.
- The IUCN Red List of Threatened Species. IUCN Red List of Threatened Species. Retrieved 2019-04-09.
- Thomas M. Donnelly, Ingrid Bergin, Melanie Ihrig, Chapter 7 - Biology and Diseases of Other Rodents, Editor(s): James G. Fox, Lynn C. Anderson, Glen M. Otto, Kathleen R. Pritchett-Corning, Mark T. Whary, In *American College of Laboratory Animal Medicine, Laboratory Animal Medicine* (Third Edition), Academic Press, 2015, Pages 285-349, ISBN 9780124095274, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409527-4.00007-9>
- Van Veen, K. 1999. Mongolian Gerbil Subjects (On-line). Accessed October 31, 2000 at <http://users.bart.nl/~fredveen/subjects1.htm>.
- Waiblinger, E. (2010). The Laboratory Gerbil. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals*. pp. 327–347. doi:10.1002/9781444318777.ch23. ISBN 978-1-4443-1877-7.

CAPÍTULO 15

El cobayo como animal de experimentación

Martin Carriquiriborde

Orígenes

El cobayo es un híbrido doméstico producto de la cruce de especies del género *Cavia*; para el año 400 DC los Incas lo criaban con fines de consumo y ofrendas a los dioses. Con la conquista española fueron introducidos en Europa y luego se distribuyeron en el resto del mundo.

Cavia aperea (cuis) y *Cavia tschudii* se cree que son las especies a partir de las cuales se originó el cobayo. Hasta la llegada de Pizarro a Perú, es poco lo que se sabe acerca su domesticación.

Taxonomía

Pertencen a la clase: Mamífera; orden: Rodentia; familia: Caviidae; género: *Cavia*; y la especie: *Cavia porcellus* (Linneo, 1758). Posee varios nombres vulgares: conejito de indias, Guinea pig, cobaya, cobayo, cuy, cuyo.

Biología general

Son apacibles, se reproducen fácilmente y son muy sensibles al frío y al calor extremo. Se adaptan rápidamente al régimen del laboratorio. Son animales sociables, pero los machos pueden ser agresivos. Son muy sensibles a los movimientos bruscos y pueden quedar estáticos durante 20 minutos o más.

La longevidad es de entre 4 y 5 años, pero se puede acortar 2 años en las hembras reproductoras.

El largo del cuerpo incluyendo la cabeza es de 14 cm y de 35 a 70 grs al nacer y 31 cm en los animales adultos que pesan entre 480 y 1300 gr, llegando algunas variedades a los 2 kgs. No tienen cola. Son de pelo y subpelo denso, que puede ser corto o largo y fino y puede presentar remolinos. Hay una gran variedad de colores. Posee abundantes glándulas sebáceas en

la zona dorsal y perianal. Sacos anales desarrollados. Ambos sexos poseen un par de pezones en la región inguinal. De extremidades cortas y desprovistas de pelos con 4 dedos en los miembros anteriores y 3 en los posteriores.

Los cobayos son herbívoros y su fórmula dentaria es I 1/1; C0/0; PM 1/1; M 3/3. Todas las piezas dentarias son hipsodontas, de raíces abiertas y crecimiento continuo de por vida. Es evidente la presencia de diastema. (Harkenes J., y col 1980).

El estómago no posee porción aglandular. Presenta un ciego voluminoso que ocupa una parte significativa del abdomen. Hígado con vesícula biliar. Los cobayos realizan la práctica de cecotrofia (ingesta de una materia fecal blanda y rica en minerales (cecotrofos) producida durante la noche), no es indispensable para la vida. No son capaces de sintetizar la vitamina C, se debe administrar de forma exógena en el alimento (hojas verdes, frutas, alfalfa) o en el agua de bebida (ácido ascórbico).

En los machos se encuentran numerosas glándulas accesorias (bulbouretrales, prostáticas, vesiculares, de conducto deferente); poseen hueso peneano. Las hembras poseen un útero con cuerpo corto y dos cuernos. La orina es muy densa y alcalina, con presencia de cristales. (Wagner J., y col. 1976).

Comportamiento

Son animales crepusculares, muy. Comen una amplia variedad de vegetales, les gusta especialmente la alfalfa. Los machos pueden pelear vigorosamente. Las jerarquías suelen establecerse rápidamente, la que se mantiene por factores olfativos y por el pelado de los machos subordinados. La vocalización parece jugar un papel importante en el comportamiento social de los cobayos y llama la atención de los cuidadores. Se han registrado al menos 11 vocalizaciones diferentes. Cuando están en grupos se huelen los genitales, periné y las orejas.

Razas, cepas y genética

Se conocen tres cepas principales: inglesa (de pelo corto, 3 a 4 cm), peruana (de pelo largo) y abisinia (presenta pelo arremolinado, rizado, agrupados en mechones o en rosetas).

El color de capa depende del genotipo, presenta 6 loci principales y otros menores. Entre los que se encuentran los Locus agutí, marrón, albino, de color, ojos rosas, manchas blancas.

Se han desarrollado un número de colonias cerradas, de stocks para ser usados como animales de experimentación. El stock DUNKIN-HARLEY (1926) está distribuido por todo el mundo, de éste se han desarrollado un gran número de sublíneas, tales como la PIRBRIGHT y la JAP- HARTLEY de esta última, se obtuvo una raza sin pelo e inmunodeficiente (Skinny, 1980) y el Charles River la comenzó a producir a partir de 1982 con fines de investigación. Existen cepas endocriadas ya desde 1915, pero solamente dos cepas endocriadas (la 2 y 13) son las más usadas.

Usos en el laboratorio

El primer registro de que se tiene del empleo del cobayo en experimentación fue en 1780 por Lavoisier para medir la producción de calor.

Los cobayos tienen muchas similitudes biológicas con los humanos, lo que los hace útiles en muchos campos de investigación. Los cobayos (conejito de indias) se han utilizado como animales de experimentación durante siglos; de allí su denominación como "conejito de indias" para un sujeto experimental humano.

Han contribuido con 23 premios Nobel de medicina, como el descubrimiento de la vitamina C, la bacteria de la tuberculosis y la adrenalina, así como con el desarrollo de vacunas para la difteria y la tuberculosis, el reemplazo de válvulas cardíacas, transfusión de sangre, diálisis renal, antibióticos, anticoagulantes y medicamentos para el asma. Hoy en día, se siguen utilizando ampliamente en la investigación biomédica, en especial en el estudio de los sistemas respiratorio, nervioso e inmunológico.

Las principales áreas en las que se utilizan los cobayos en la investigación en la actualidad son:

- Alergias y enfermedades respiratorias: las vías aéreas de los cobayos son muy sensibles a los alérgenos, y su uso en estudios del asma fueron fundamentales para el desarrollo de los medicamentos inhalatorio.
- Investigación nutricional: por la necesidad de incorporar por su dieta vitamina C y niveles elevados de ácido fólico, arginina, tiaminas y potasio, lo vuelven útiles en estudios de nutrición. Además, se emplean para el estudio del colesterol y metabolismo de lipoproteínas por portar el colesterol en lipoproteínas de baja densidad,
- Audición: la estructura del oído muy similar a la de los humanos y un rango de audición parecido, también presentan el reflejo de Preyer utilizado para la sordera.
- Pruebas de seguridad: La similitud de su sistema inmunitario, y particularmente su sensibilidad cutánea, fue lo que provocó su uso extendido para testar reacciones alérgicas de la piel

Actualmente, su uso para testar alergias de piel ha sido sustituido en gran medida por el ensayo del nódulo linfático local (LLNA), más moderado, que utiliza ratones y en menor cantidad. En 1999 muchas de estas pruebas se realizaron con cobayos, sobre todo para productos no médicos. En la actualidad, rara vez se emplean cobayos.

Producción

Microambiente

Hay una gran variedad de cajas incluyendo jaulas en el piso, estantes fijos, racks móviles con jaulas de metal o de plástico.

Jaulas en el piso: desde ladrillos a bloques de concreto con división metálica. Las paredes deben ser de 40 cm de alto (25 cm mínimo).

Jaulas: Hay una amplia variedad de cajas y en distintos materiales. Jaulas de metal y plásticas, con piso sólido o de alambre. Se recomiendan las jaulas con piso de alambre.

Los animales adultos deben disponer de una superficie de 652 cm²/animal.

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 estos animales tienden a tomar agua con el alimento en la boca lo que ocasiona que el alimento sea introducido dentro del bebedero y terminen taponando el pico, por lo que el agua de bebida de ser suministrada diariamente.

Es recomendable que el alimento balanceado esté formulado únicamente para ellos (18-20 % proteínas, 10-15 % fibras), se le suministra *ad-libitum* en comederos tipo tolva, requiere una dosis alimentaria diaria de 10 mg/kg de p.v. de ácido ascórbico (200 mg/litro de vitamina C en el agua de bebida, la actividad de la vitamina disminuye en un 50% en 24 horas, o suplementarlo con hojas verdes, fruta o alfalfa).

Macroambiente

El rango de temperatura oscila 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. La humedad relativa del 30 al 70%. Los cobayos son muy sensibles a los ruidos, al igual que las otras especies.

Deben tener un periodo lumínico comprendido entre 12 a 16 horas por día. Son sensibles al polvo y al olor. (Zúñiga J. y col. 2016).

Manejo reproductivo

Ciclo reproductivo

Las cobayas son poliéstricas continuas; presentan estros cada 15-17 días. Tras el parto se produce un celo que presenta un 60 al 80 % de fertilidad. La pseudogestación es rara y en caso de que se produzca dura aproximadamente 17 días.

El periodo de gestación es de 63 a 70 días y varía sustancialmente con el tamaño de la camada. Las crías nacen con pelos, con los ojos y oídos abiertos y los dientes bien desarrollados y caminan de forma casi inmediata. Unas 12 a 14 horas después del parto la madre limpia el área genital de los recién nacidos para estimular la micción y defecación. El promedio de crías por camada es de 3 a 4, los recién nacidos pesan como promedio 80-90 grs., los que nacen

por debajo de 50 grs. generalmente mueren a poco de nacer. Los neonatos pueden ingerir alimentos sólidos desde la primera semana de vida y la microflora intestinal que necesitan la obtienen comiendo las heces de sus madres.

El destete se realiza a los 14 a 21 días de edad o bien cuando alcanzan un peso de 150 a 200 gramos. La madurez sexual en las hembras se produce entre las 4 a 5 semanas de edad, aunque su periodo óptimo de apareamiento es a los 3 meses cuando pesan 450 grs. Los machos maduran más lentamente y se los considera fértiles entre las 8 y 10 semanas, aunque no conviene aparearlos hasta los 3 meses con un peso de 500 gramos.

Sistema monogámico

Con este sistema se aparea un macho y una hembra en la misma caja. Este sistema se usa para producir animales endocriados. Al aprovechar el celo post parto cada hembra desteta mayor número de crías.

Sistema poligámico

Cada macho se lo puede alojar con 10 hembras. Se puede usar los sistemas de reproducción intensiva o no intensivos, en este último, se separa la hembra preñada y se la devuelve post destete.

Identificación

No hay un método ideal de identificación: Se utilizan tatuajes en las orejas con letras de 0,5 por 0,25 cm., se usa tinta negra para animales albinos y verdes para animales coloreados, pero son difíciles de leer. También se utilizan caravanas, pero tienen el inconveniente de que suelen ser arrancadas durante alguna pelea.

Los animales con color se identifican por las manchas y patrones de color. Para identificaciones temporarias se utilizan colorantes como fucsina, violeta de metilo, azul tripano etc. (Dahlborn, K., y col. 2013).

Manejo

Los cobayos son animales muy tímidos y nerviosos. Cuando el operador se aproxima se da vuelta 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. Deben tomarse con firmeza. Si se lo sujeta con los dedos pulgar e índice alrededor del cuello, el animal se siente más relajados. Cuando se sujeta las hembras preñadas, debe hacerse delicadamente, y con una mano coloca bajo los cuartos traseros, para soportar el peso del vientre, para evitar que se produzca un desgarro del útero.

Sexado

El cobayo macho carece de abertura genital entre el orificio uretral y el ano. La hembra posee una abertura en forma de U (la membrana vagina) en dicho espacio. Para poner de manifiesto dicha membrana, debe colocarse el índice y pulgar de cada mano a ambos lados de la protuberancia urogenital. Al separar suavemente los dedos, a la vez que se ejerce cierta presión, se revela la membrana. En los machos, se palpan fácilmente los testículos y el pene. Este último, a su vez, puede exteriorizarse mediante una ligera presión digital.

Administración de drogas y otros compuestos

Las practicas se realizan igual que en las especies anteriores.

Vía	Sitio recomendado	Aguja	Vol. Max.
Oral (O)		Sonda gástrica	20 ml/kg
Intradérmica (ID)	Región dorsal del cuello o flanco	27 G	100 µl/kg
Subcutánea (SC)	Región dorsal del cuello o flanco	23 G	1 – 2 ml por sitio
Intraperitoneal (IP)	Abdomen	21-25 G	10 – 15 ml
Intramuscular (IM)	Cara posterior del cuádriceps	27 G	0,3 ml
Endovenosa (EV)	Vena safena	25-27 G	0,5 ml

Tabla 1 Vías de inoculación, volumen del inoculo, lugar anatómico de inoculación y calibre de la aguja (Morton D. B., Orellana Muriana J. M. 2002).

Colecta de sangre

Volúmenes menores a 100 µl: vena safena y yugular

Se puede realizar la cateterización de la vena yugular y femoral

Por punción intracardíaca, previa anestesia. Se pueden realizar sangrado repetido en intervalos cortos: hasta el 1 % del volumen circulante por día. En el sangrado único, se puede extraer hasta el 10 % de la sangre circulante en animales sanos como máximo. Volumen de sangre circulante 80 ml/kg. También se puede utilizar la decapitación en estudio que lo requiera.

Enfermedades de mayor prevalencia

Hipovitaminosis C

Es la falta de vitamina C (en la dieta). Los cobayos poseen un déficit genético de la enzima que convierte la glucosa en ácido ascórbico. Los animales jóvenes sufren más esta enfermedad que se manifiesta a partir de las 2 semanas de la falta de aportes de la vitamina.

El cuadro clínico es poco específico (hemorragias en encías y articulaciones, pérdida de dientes y maloclusión, rechinar de dientes, mala calidad de pelo, anorexia, diarrea, etc.).

Neumonía

Producidas por *Bordetella bronchiseptica* y *Streptococcus pneumoniae*. (Malcolm Hime J., O'Donoghue P 1984).

Es una enfermedad muy frecuente en cobayos mantenidos en grupos y con poca higiene. Es muy grave en animales jóvenes o en situaciones de mucho estrés.

Se manifiesta por descargas óculo-nasales que se pueden diseminar y terminar en una bronconeumonía purulenta, lesiones en bulas timpánicas, útero, pleura, pericardio, producir abortos, artritis séptica, etc.

Pododermatitis

Problema relativamente frecuente en cobayos obesos por dietas excesivamente energética, ejercicios restringidos, mantenidos en jaulas con rejilla en el piso o con lechos abrasivos. Suele darse en animales adultos u obesos. Se manifiesta por una hiperqueratosis que pasa a úlcera plantar, que puede volverse crónica, infectarse y complicarse hasta una osteomielitis y necrosis de la extremidad. Se puede complicar con *Staphylococcus aureus*.

Toxemia de la gestación

Enfermedad que se da principalmente en hembras primíparas con exceso de peso, que ayunan durante dos semanas y previas y una posterior al parto. Se observa postración, anorexia, disnea y rápidamente síntomas nerviosos que terminan en la muerte en 2 a 5 días.

Terapéutica

Los antibióticos administrados oralmente son susceptibles de alterar el delicado equilibrio bacteriano digestivo, por lo que se recomienda utilizar la vía parenteral a la vía oral. Se recomienda siempre que se administren ATB, ofrecer reconstituyentes de la flora digestiva con el fin de evitar disbiosis iatrogénica y enterotoxemia.

No utilizar nunca penicilina y sus derivados porque tiene efectos tóxicos en los cobayos.

Referencias

- Dahlborn, K., et al. (2013). Report of the Federation of European Laboratory Animal Associations Working Group on animal identification, *Laboratory Animals*, 47: 2-11
<http://lan.sagepub.com/content/47/1/2.full.pdf+html>
- Harkenes J., Wagner J. (1980). *Biología y clínica de conejos y roedores*. Ed. Acribia.
- Malcolm Hime J., O'Donoghue P. (1984). *Patología de los Animales de Laboratorio Diagnóstico y Tratamiento*. Ed. Acribia.
- Morton D. B., Orellana Muriana J. M. (2002). *Refinando los procedimientos para la administración de sustancias*. Ed. Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio
- Wagner J., Manning P. (1976). *The biology of the guinea Pig*. Ed. Academic Press.
- Zúñiga J., Tur Mari J., Milocco S., Piñeriro R. (2016). *Ciencia y Tecnología en protección y experimentación Animal*. Ed. McGraw – Hill. Interamericana.

CAPÍTULO 16

El conejo como animal de experimentación

Martín carriquiriborde

Origen

El conejo 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 posteriormente en las colonizaciones se introdujeron en Australia, Nueva Zelandia y América.

Según Nachtsheim (1949) el conejo fue domesticado en el siglo I a.C., los romanos tenían conejos en jardines cerrados. (Zuener 1963) sugiere que la primera experiencia en domesticación se llevó a cabo en Francia entre los siglos VI y X d. C.. 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.

Taxonomía

Pertencem a la clase Mamalia; orden: Lagomorpha; familia: Leporidae, género: *Oryctolagus* y a la especie *Oryctolagus cuniculus*

Biología general

Se diferencia de los roedores principalmente por el segundo par de incisivos superiores. La fórmula dentaria es la siguiente: I 2/1; C 0/0; PM 3/2; M3/3. No presentan caninos y 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.

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 como por ejemplo la naturaleza de los dientes, la gran producción de bilis, los intestinos volu-

minosos y el gran ciego terminado en un apéndice vermiforme. La característica que distingue a este animal es el hábito de la cecotrofia o pseudoruminación. Consiste en la reingestión de pellets de materia fecal blanda, la cual se excreta en horas de la mañana y es tomada directamente del ano. Estos pellets contienen el doble de proteína y la mitad de fibra que los de materia fecal dura. Esto se debe a que presenta en el ciego bacterias productoras de vitamina B. Esta práctica comienza entre la tercera y cuarta semana de vida, a aquellos que no se les permite realizarla mueren dentro de las 3 semanas. Este hábito no es practicado por conejos SPF.

En cuanto al aparato genital, los machos jóvenes presentan una abertura genital protuberante, sumamente marcada, en cambio las hembras tienen una abertura poco manifiesta. En los machos adultos el escroto es perfectamente visible, de localización inguinal, carentes de pelo y anterior al pene. (Harknes J., y col. 1980).

Razas y cepas

La American Rabbit Breeders Association (Asociación Americana de Criadores de Conejos) tiene una lista estándar 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 o con fines experimentales. Como representativas entre las razas de mayor tamaño (mayores de 5 kg. de peso vivo) habría que señalar al Gigante de Flandes o al Gigante de Checkered; entre las razas de tipo medio (2 a 5 kg. de p. v.) más conocidas están la raza Californiana o Neozelandesa, estas han sido desarrolladas 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. de p. v.) cabe señalar la Holandesa y la Polaca, muy apreciadas como mascotas.

Existen pocas cepas desarrolladas para fines de laboratorio. Actualmente existen 6 cepas endocriadas. Esto se debe a que es muy costoso establecer una producción de animales endocriados porque disminuye la productividad, aumenta la susceptibilidad a enfermedades infecciosas y aumenta la mortalidad.

Usos en el laboratorio

Se utiliza en investigaciones en cirugía experimental de ojo, mandíbula, cardiovascular y estudios de hipertensión.

Estudios sobre reproducción, puesto que la ovulación no es espontánea, no hay anestro estacional, la gestación es corta y el semen se puede recolectar fácilmente. Se usan para el estudio de anticonceptivos orales.

En serología, producción de anticuerpos y para screening de agentes embriotóxicos y teratogénicos; otras aplicaciones son para cría de moscas tsé-tsé. Test de irritación dérmica y ocular para el control de productos cosméticos y formas medicamentosas del tipo de colirios o

pomadas. Modelo en oftalmología y trasplante de tumores en esa zona por la gran vascularización. Vías respiratorias: enfisema, asma, fibrosis quística. Otitis media. También se utiliza con fines pedagógicos para anatomía y fisiología experimental.

Producción:

Microambiente

Las grandes habitaciones como para criar entre 200-300 animales ofrece ciertas ventajas, pero es muy difícil el control de las enfermedades. Las habitaciones más pequeñas permiten separar a los animales en clases. Lo ideal son cuartos para alojar entre 50-60 animales.

Debe disponer de un área de alojamiento apropiada a su tamaño y peso, razas pequeñas (0,14 m²), medianas (0,28 m²) y grandes (0,37 m²). Las conejas con cría requieren una superficie adicional de 0,19 m².

Se usan jaulas metálicas, las medidas mínimas requeridas son de 48 cm. de ancho por 61 cm. de largo y 46 de altura. Presenta una abertura en la cara posterior para colocar otro compartimiento, para que los reproductores puedan criar a sus gazapos. Su cara anterior debe estar provista de comederos tipo tolva y bebederos de sifón o mamadera. El piso de las jaulas es de una malla de alambre con una separación es 26 mm. entre alambre y alambre, de este modo se evitan problemas de tarso.

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 a 20-25 animales recién destetados. Como cama se utiliza paja sobre piso de concreto, el cual tiene una pequeña inclinación hacia la canaleta de desagüe. A partir de los tres meses de edad, es muy aconsejable el alojar a los animales en jaulas individuales.

Cuando se acerca el momento del parto se colocan nidos. Para crías de tamaño mediano se utilizan nidos de 30 cm. de ancho por 38-40 cm. de largo, por 25 cm. de alto, pero son caras y difíciles de desinfectar, por lo que se recomiendan nidos descartables.

Se deben esterilizar a intervalos regulares. Las jaulas de metal se autoclavan o se sumergen en sustancias desinfectantes. Las de madera se cepillan con una solución desinfectante.

Deben alimentarse siempre con un preparado comercial de alta calidad, en forma de pellets, y administrado ad-libitum. Se calcula un consumo diario de 5 gramos por cada 100 gr. de peso vivo. 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. (Zúñiga J., y col. e2016).

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.

Temperatura: toleran grandes fluctuaciones térmicas (entre -7 y 28 °C), es deseable un rango de 15 a 20 °C.

Ventilación: es muy importante una buena ventilación. Se recomienda entre 15 a 20 recambios de aire por hora.

Humedad: se recomienda entre 50 y 55 % de humedad relativa.

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 cubren a las 2 semanas de producido el parto, destetándose los gazapos a las 4 semanas, a pesar 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 coneja puede proporcionar 8 camadas por año.

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

Detección del 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 coneja 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, aunque no es muy método del todo seguro.

Hay que tener en cuenta que exhibe una 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 realizar la cubrición. Dicho chequeo se realiza observando el comportamiento de la hembra frente al macho, la cual presente una lordosis pronunciada.

Para diagnosticar la preñez se usa la técnica de palpación abdominal suave. Se puede detectar ya a los 9 días postservicio, 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 tem-

prano de preñez es importante porque facilita el manejo de las hembras preñadas y permite el re-apareamiento de las que no se preñaron.

En los últimos 3 días de gestación la coneja arranca pelo de su abdomen, empleándolo como material para el nido. Si se trabaja con jaulas metálicas se les debe proveer de un nido o caja y de material para que lo arme (paja, viruta, etc.), 3 o 4 días antes del parto.

Tras la cubrición 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 y 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. 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.

Recién nacido

Nacen inmaduros y dependen totalmente de la madre, presentan el pelo muy corto y rápidamente pierde calor, lo que puede ser fatal para los gazapos si se caen del nido.

Es sorprendente el desarrollo que se produce ya a la primera semana, crece muy rápido, el pelo le crece también rápido y los movimientos son ya fuertes. No abre los ojos hasta el día décimo. Puede salir del nido a la tercera semana y come alimento sólido. (Fuentes Parede F., y col. 2010).

Identificación

Se utilizan métodos permanentes, como el uso de anillos, tatuajes, muescas, clips o botones de colores con número de código en las orejas. Estos últimos no se recomiendan porque suelen desengancharse y lastimar las orejas. Para animales recién nacidos se recomienda la marcación por medio de muescas o con colorante como el violeta de genciana. Existe una gran

variedad de anillos para las patas y se colocan en la articulación del tarso antes de las 8-12 semanas. (Dahlborn, K., y col. 2013).

Sujeción y sexado

La sujeción debe ser suave, pero firme, ya que los animales perciben la inseguridad y forcejean, pudiendo producirse fracturas o heridas al manipulador. Los jóvenes se pueden levantar y transportar animales grandes, se toman juntos las orejas y la piel suelta de los hombros con una mano y se coloca sobre el otro brazo y contra el cuerpo, sujetando el anca para alivianar el peso. para trayectos largos son aconsejables jaulas, cestos o cajas. En cualquier caso, conviene recordar que las orejas del conejo son sumamente frágiles y sensibles, de ahí que no debe empleárselas para sujetar o levantar a los animales.

En cuanto al sexado, los machos jóvenes presentan una abertura genital protuberante, sumamente marcada, en cambio las hembras tienen una abertura poco manifiesta. En los machos adultos el escroto es perfectamente visible, de localización inguinal, carentes de pelo y anterior al pene.

Administración de drogas y otros compuestos

Las practicas se realizan igual que en las especies anteriores.

Vía	Sitio recomendado	Aguja	Vol. Max.
Oral (O)		Sonda gástrica	5 ml/kg
Intradérmica (ID)	Región dorsal del cuello o flanco	27 G	100 µl/kg
Subcutánea (SC)	Región dorsal del cuello o flanco	21 G	1 - 5 ml por sitio
Intraperitoneal (IP)	Abdomen	21 G	15 ml
Intramuscular (IM)	Cara posterior del cuádriceps	27 G	0,5 - 1 ml
Endovenosa (EV)	Venas marginales de la oreja	23-25 G	1 - 10 ml

Tabla 1 Vías de inoculación, volumen del inoculo, lugar anatómico de inoculación y calibre de la aguja (Morton D. B., y col. (2002).

Colecta de sangre

Se obtienen pequeños volúmenes de las venas marginales de la oreja o de la arteria central de la oreja o por punción cardiaca y bajo anestesia, esta última se emplea sólo para sangría en blanco.

Eutanasia

Se los puede sacrificar por dislocación del cuello o por sobreanestesia con pentobarbital sódico en 200 mg/kg de peso, o con dióxido de carbono.

Anestesia

Las drogas que se emplean son: Anticolinérgicos: glicopirrolato 0,5 mg/kg por vía intramuscular (IM), tranquilizantes: fenotiacina, sedantes: midazolam 1mg/kg vía IM, analgésicos: xilacina 5-10mg/kg vía IM., agentes disociativos: ketamina 25-40mg/kg vía EV y pentobarbital sódico 15-40 mg/kg vía EV

Signo de salud y enfermedad

Los animales sanos están alertas, activos y en buenas condiciones físicas. Los ojos son claros y brillantes y el pelaje suave y brillante, excepto cuando pelecha. También tienen buen apetito, por lo tanto, la comida es consumida rápidamente y la ganancia diaria de peso es continua.

Inversamente cuando el animal está enfermo se muestra desinteresado por lo que lo rodea, está acurrucado generalmente en el fondo de la jaula, y aletargado e indiferente, con el pelo hirsuto. También presenta pérdida del apetito, con disminución del estado general. Puede tener problemas respiratorios con respiración dificultosa, descarga nasal, diarrea o descarga de mucus, chirrido de dientes.

Las enfermedades más comunes y contagiosa son: la pasteurelosis, mixomatosis, enteritis, enterotoxemia, salmonelosis, colibacilosis, estreñimiento, mastitis, dermatitis, entre las más importantes (Malcolm Hime J., y col. 1984).

Referencias

- Dahlborn, K., et al. (2013). Report of the Federation of European Laboratory Animal Associations Working Group on animal identification, *Laboratory Animals*, 47: 2-11
<http://lan.sagepub.com/content/47/1/2.full.pdf+html>
- Fuentes Parede F., Mendoza Yanavilca, R.A., Rivera Rodríguez R., Vara Márquez M. D. (2010). Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: conejos. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú
- Harkenes J., Wagner J. (1980). *Biología y clínica de conejos y roedores*. Ed. Acribia.
- Malcolm Hime J., O'Donoghue P. (1984). *Patología de los Animales de Laboratorio Diagnóstico y Tratamiento*. Ed. Acribia.
- Morton D. B., Orellana Muriana J. M. (2002). *Refinando los procedimientos para la administración de sustancias*. Ed. Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio
- Zúñiga J., Tur Mari J., Milocco S., Piñeriro R. (2016). *Ciencia y Tecnología en protección y experimentación Animal* Ed. McGraw – Hill. Interamericana.

CAPÍTULO 17

El perro y el gato como animales de experimentación

Ana C. Carranza Martin

Introducción

Los caninos y felinos domésticos son menos utilizados como animales de laboratorio que la rata y el ratón. Entre sus usos en investigación como modelo animal podemos mencionar para los caninos: estudios cardiovasculares, arteriosclerosis, shock endotóxico, técnicas quirúrgicas, estudios digestivos, estudios metabólicos, odontología o para estudios dentro de la misma especie como pueden ser pruebas de palatabilidad de alimentos balanceados. Los felinos pueden ser utilizados para: desarrollo de fármacos (especialmente en drogas que actúen a nivel del sistema nervioso central), en investigaciones neurológicas, en investigaciones de patologías cardiovasculares, en estudios motrices (por tener desarrollados sus reflejos) y en estudios de comportamiento. Además, los felinos pueden ser modelo animal para felinos silvestres y para el conocimiento de la propia especie (Zúñiga, 2008).

Taxonomía

Perro

Clase Mamífero
Orden Carnívoro
Familia Canidae
Genero *Canis*
Especie *Canis familiaris*

Gato

Clase Mamífero
Orden Carnívoro
Familia Felidae
Género *Felis*

Especie *Felis silvestris*

Subespecie *Felis silvestris catus*

Sentidos

Los sentidos le permiten al animal relacionarse con el medio, conocerlos nos facilita la comprensión y el manejo de la especie

Olfato

Los perros tienen el olfato mejor desarrollado que el ser humano. Se estima que los perros tienen aproximadamente 50 veces más receptores olfativos que este; en el humano hay aproximadamente 5 millones de células olfativas frente a 200 – 300 millones presentes en la nariz del perro. Además, el área cerebral dedicada al olfato es 40 veces mayor en los cánidos. A través de los olores el perro puede reconocer objetos y otros animales de forma precisa y a una distancia relativamente grande. Se puede decir que los perros crean un mapa olfativo fiel de su entorno. En los felinos el olfato ocupa el tercer lugar, después de la vista y el oído. Es muy importante en la sociabilización, principalmente por el reconocimiento de feromonas a través del órgano vomero-nasal, y en la alimentación. En el caso del gato su umbral de detección de olores es bajo, sin embargo, depende de la sustancia, el aroma en cuestión y del aprendizaje previo.

Gusto

En el caso de los perros tienen la capacidad de diferenciar algunos sabores entre ellos el amargo y los dulces, pero no así lo salado. El gato puede percibir los cuatro sabores (ácidos, amargos, salados y dulces). Pudiendo diferenciar muy bien el amargo y el ácido, lo que dificulta la administración oral de medicamentos y en la vida diaria los ayuda a distinguir tóxicos.

Oído

Los perros cuentan con sentido de la audición superior al de los humanos, pueden percibir sonidos muy débiles y a grandes distancias. El espectro auditivo de una persona es de 20-20.000 Hz mientras que el de los perros es de 20-65.000 Hz y la variedad de espectro a la que son más sensibles es de 500 a 16.000 Hz. En el caso de los felinos tienen un oído muy desarrollado, pueden detectar gran gama de sonidos, principalmente los agudos, aunque los graves también. Pueden percibir sonidos de baja intensidad y la adaptación o fatiga a sonidos constantes son poco marcadas llevando a una irritabilidad del animal frente a estos ruidos. Pueden localizar el origen del sonido con facilidad moviendo sus pabellones auriculares.

Vista

Los perros cuentan con dos tipos de receptores de color (conos) por lo que tienen visión dicromática, por otro lado, cuentan con mayor número de bastones lo que favorece la visión en condiciones de baja iluminación. El gato tiene sus ojos frontales, es decir dirigidos hacia adelante, esto le permite tener una mejor percepción de relieves y distancias. Además, poseen el cristalino móvil que permite enfocar rápidamente a su presa. Tienen visión dicromática, poseen dos tipos de conos. Se puede suponer que distinguen colores y matices que se desprenden del rojo y el verde. Por otro lado, tienen el ojo desarrollado para una visión nocturna superior a la humana.

Tacto

La piel detecta presión y temperatura, principalmente en las extremidades y en la cara. Los perros poseen pelos sensoriales alrededor de los ojos, las mejillas, los labios y bajo la mandíbula, que les sirven para identificar objetos y orientarse en la oscuridad. Los gatos tienen vibrissas táctiles con terminaciones sensitivas en los bigotes, cejas y carpos que les permiten ubicarse espacialmente.

Alimentación

Para los perros el momento de alimentación es muy importante, principalmente para el marcado de dominancia y mantener así la jerarquía. Por otro lado, suelen tener un apetito voraz y comer todo el alimento suministrado en un solo momento. Lo ideal es poder suministrar el alimento dos veces por día, siempre comenzando con el dominante del grupo. La cantidad ideal es de 90 Kcal/Kg por día en adultos y 300 Kcal/kg por día para hembras gestantes. Normalmente la alimentación ad-libitum en esta especie es complicada ya que pueden comer mucho más de lo que necesitan, principalmente si están en grupos y comen por competencia. Luego del momento de la alimentación lo más probable es que defequen por lo que la alimentación, la limpieza y el paseo deben estar coordinados para facilitar el manejo. Primero se les debe dar de comer, luego se los saca a pasear, mientras se limpian sus caniles (Hubrecht, 2010a).

Los gatos adultos necesitan 70 kcal/kg, mientras que las hembras en gestación y lactantes necesitan consumir 250 kcal/kg aproximadamente. El gato si tiene alimento a su disposición prefiere hacer de 10 a 16 pequeñas comidas de 2 a 3 minutos de duración. Las preferencias alimentarias parecen estar muy influenciadas por la experiencia adquirida al comienzo de su vida. Los gatitos consumen por imitación los mismos alimentos que su madre, y en la mayoría de los casos preferirá los alimentos que consumió de pequeño. A diferencia del perro, los gatos no marcan su jerarquía a través de la alimentación (Hubrecht, 2010b).

Razas más utilizadas

Lo más importante a la hora de seleccionar un animal para nuestros estudios es que este tenga un buen comportamiento, que se adapte a sus congéneres (no sean dominantes) y que sean sanos.

En felinos, no existe una raza definida que sea utilizada para experimentación. Normalmente se utilizan individuos mestizos hermanos o medios hermanos para disminuir la variabilidad genética. Idealmente se deben conocer sus padres para prevenir enfermedades congénitas además de que deben ser dóciles, adaptados al cautiverio y sociables. Preferentemente de pelo corto para un mejor manejo de los animales, ya que es más fácil observar posibles lesiones en piel, mejor observación para inoculaciones, toma de muestra y menos problemas digestivos.

En el caso de los caninos la especie más utilizada son los Beagle. Esto se debe principalmente porque son de pequeño tamaño, de pelo corto, dóciles, aprenden con facilidad y tienen vasos sanguíneos grandes en relación al tamaño. Por otro lado, porque se han desarrollado líneas específicas para investigación.

Reproducción

La perra presenta un ciclo estral con fases prolongadas. El proestro en esta especie dura entre 4 y 15 días, promedio de 9 días. Comienza cuando la hembra presenta una descarga vulvar sanguinolenta hasta que se deja servir. La hembra atrae a los machos debido a la presencia de feromonas que estimulan los receptores olfatorios del macho. El estro tiene una duración variable de 5 -10 días. El comienzo del estro lo marca la aceptación del macho por parte de la hembra. El diestro tiene una duración promedio de 60 días. En caso que la hembra no haya sido servida, al final de esta etapa puede presentar una *pseudogestación*. Por otro lado, en caso que la hembra haya recibido servicio y esté preñada en este periodo se dará la gestación, el parto y la lactancia. El anestro es un período de reposo sexual donde no hay cambios hormonales, la hembra no presenta síntomas particulares ni tampoco alteraciones en el comportamiento (Hubrecht, 2010^a).

La gata es poliéstrica estacional, con fotoperíodo positivo, es decir, las principales estaciones reproductivas son la primavera y el verano. Aunque en algunas situaciones donde la luz sea de 12 horas o mayor, pueden ciclar todo el año. Durante el ciclo estral, la hembra puede presentar varias fases foliculares mostrando signos de celo, sin tener fase lútea (interestro). Si la hembra ovula y es servida por un macho fértil presentará una preñez, en cambio cuando no es fertilizada presentará pseudogestación. El período de inactividad sexual se denomina anestro (Hubrecht, 2010^b).

La pubertad en el perro y gato se da cuando alcanzan el 80% del peso adulto. En el caso del gato las hembras, y en menor medida el macho, la estación del año y las horas luz pueden

influir en la pubertad, necesitando 12 horas luz para comenzar el ciclo. La gestación dura entre 63 a 65 días. El tamaño de la camada puede variar, pero el promedio son 4 a 5 cachorros, los cachorros caninos pesarán según el tamaño de sus progenitores y los gatitos pesarán aproximadamente 100gr. Es necesario aislar a la hembra una semana antes de la fecha estimada de parto, para que esté tranquila, pueda armar el nido y no se sienta amenazada por el resto de los habitantes de la colonia. El período de socialización de los cachorros es en las primeras 12 semanas de vida para el perro y 8 semanas de vida para el gato. Este momento crucial para adaptar a los individuos a los procedimientos de rutina, como puede ser el pesado, técnicas de sujeción para que tengan una mejor adaptación al medio y no sufran estrés durante el procedimiento y no sean agresivos con el personal (Hubrecht, 2010ab).

La sociabilización comienza cuando el cachorro empieza a separarse de la madre y son atraídos por la interacción con el ambiente y sus hermanos. Durante este periodo observamos la mayor maduración neurológica, física y conductual. El sistema locomotor es capaz de permitir que los cachorros (felinos y caninos) reaccionen a diversos estímulos externos, el sistema nervioso se acerca al del adulto y comienza el aprendizaje. Si a un cachorro se le priva en este período el contacto con humanos, en el futuro tendremos un animal que nunca tolerará la presencia cercana de ellos. Siempre se sentirá incómodo, y manifestará un comportamiento huidizo, de miedo o agresivo en el caso de que no tenga escapatoria. Cabe destacar que el cachorro que permanece confinado a una jaula como único ambiente conocido desde el nacimiento hasta las 14 semanas, presentará un miedo generalizado a otros ambientes diferentes. Incluso aquellos que han sido criados en ambientes pobres en estímulos, mostrarán dificultades de adaptación a ambientes más abiertos, complicados y estimulantes, llegando en casos extremos a una falta total de interés por explorar nuevos ambientes fuera del conocido. Además, si sometemos a un cachorro a una experiencia negativa, será capaz de memorizar esa experiencia y reaccionar igual si esta se repite. Si el acontecimiento negativo supone un trauma este puede desocializarse y reaccionar con miedo o evitación ante sucesos similares. La sociabilización de estas especies es fundamental para que se habitúen a la manipulación y procedimientos que se realizarán posteriormente.

Alojamiento en bioterios

Los animales que sean utilizados para la investigación pueden tener propietarios y vivir en sus casas, si se necesita más atención pueden vivir temporalmente en el bioterio y luego volver a sus casas, o pueden provenir de la producción propia del bioterio.

El bioterio de estas especies además de tener oficinas donde trabaja el personal, debe contar con:

- Sala de cuarentena: donde se alojarán los animales externos al bioterio antes de ingresarlos para evitar el contagio a los animales que se encuentran en el bioterio con posi-

bles enfermedades. Por otro lado, los animales comienzan a adaptarse a las rutinas y familiarizarse con el personal.

- Sala de reproductores donde se encuentren los animales adultos padres de los individuos que se van a utilizar.
- Sala de maternidad: para colocar las madres antes del parto, estas idealmente tienen que estar bien calefaccionadas y contar con jaulas grandes donde cada hembra pueda armar su nido.
- Salas de experimentación: habitaciones con los animales bajo la experiencia.
- Clínica y sala de internación.
- Quirófano.
- Sala o patio de recreación donde el animal pueda correr y jugar.

Macroambiente

El macro ambiente, tanto para los perros como para los gatos, va a ser el lugar que rodea los caniles o las gateras. La temperatura de esta habitación debe ser de entre 15 a 21 °C, con una humedad de entre 40 a 60%. Los recambios de aire deben ser de 20 a 50 por metro cúbico por hora por animal. La iluminación es muy importante, principalmente para los gatos, sobre todo si trabajamos con animales adultos no castrados, ya que su ciclo va a depender de ella. Se deben evitar los ruidos porque al ser especies muy sensibles con poca adaptación al ruido constante puede aumentar el estrés y la irritabilidad de los animales (Meunier, 2014; Zúñiga, 2008).

Microambiente

El microambiente es el espacio que rodea a los animales. En el caso del perro puede instalarse en lugares abiertos (al aire libre) o cerrados. Lo ideal es que sean mixtos con una zona abierta y otra techada calefaccionada, sobre todo para los reproductores, animales que no se encuentren bajo experiencia o para aquellos cuyo tratamiento lo permita. Las jaulas y caniles, son temporales respetando el espacio para cada animal, en lo posible deben ser grupales o permitir al animal que pueda ver u oír a sus pares. El suelo puede ser blando (principalmente en la zona libre) o de concreto con una inclinación de 3 a 5 % para facilitar la limpieza, no debe ser resbaladizo y se debe proveer de cama para que puedan acostarse; o en el caso de jaulas pueden ser de plástico o metálico, en este caso también se deben proveer de material blando de cama. Por otro lado, los perros deben tener paseos no menores a 30 minutos o un recinto de juegos donde puedan estar, correr, jugar y socializar con otros perros (Zúñiga, 2008).

En el caso del gato se puede dividir en dos grupos: gateras grupales o en jaulas individuales. Las gateras grupales consisten en habitaciones o jaulas grandes donde pueden convivir

varios individuos. Lo recomendado es no más de 20 animales ya que se dificulta la limpieza y sanidad del ambiente. Ésta es la forma ideal de contener los animales de experimentación, ya que permite el desarrollo de su comportamiento normal. Las gateras pueden tener salida al exterior techada, o ventanas que permitan a los animales distraerse. Las jaulas individuales pueden usarse en parte del experimento. Puede ser para una toma de muestra o la recuperación de un procedimiento. Sin embargo, no se recomienda que los animales vivan allí de forma permanente. Es importante que estas sean más altas que anchas ya que al gato le gusta trepar. Las medidas estándar que se utilizan son 40cm de ancho y 60cm de alto. Se recomienda colocar dentro de la jaula el alimento y el agua lo más alejado posible las bandejas sanitarias. Por otro lado, el número de bandejas sanitarias establecidas es una por animal y una más, para mantener el ambiente más limpio y sin olor. Se debe propiciar un lecho que puede ser almohadones, alfombras, camas, donde puedan dormir (Zúñiga, 2008).

Tanto para perros como para gatos es fundamental respetar el grupo con el que viven y no cambiarlos constantemente de compañeros porque esto aumenta el estrés y las peleas entre ellos. Los perros tienen a un dominante y pueden convivir sin dificultades un macho con varias hembras, varios machos o varias hembras. En el caso de los gatos estos no tienen un sistema de dominancia, son individuos sociables pero individuales. Para evitar actitudes agonísticas en esta especie se pueden alojar un macho con varias hembras o grupos de hembras. Los machos no castrados en edad adulta manifiestan comportamientos agresivos (Meunier, 2014).

Transporte

Los requerimientos necesarios a la hora de transportar un animal van depender de la distancia y horas de viaje. En viajes especialmente largos se recomienda que el animal esté en ayunas unas 8-10 horas antes de viajar, especialmente para evitar vómitos. Se pueden utilizar jaulas transportadoras. En el caso de los gatos muy asustadizos se le puede agregar feromonas para que el animal se sienta seguro y cómodo. Si el viaje es largo se debe proporcionar agua fresca en momentos de descanso. En caso de ser necesario se puede suministrar ansiolíticos y/o sedantes.

Riesgos físicos y biológicos

Los accidentes físicos son los más frecuentes e incluyen: mordidas, rasguños, cortes con material de filo o punciones con material puntiagudo, quemaduras, congelamiento, caídas, golpes en general, lesiones por cargar animales. Las mordidas y los arañazos son las lesiones físicas más comunes que podemos sufrir. Los perros al morder pueden ejercer una fuerza suficiente para causar gran daño a los tejidos, al estar combinada con tracción o desgarramiento. Ade-

más, se pueden contraer infecciones. Por otro lado, en el caso de los perros los ladridos pueden afectar nuestra audición.

El riesgo biológico que se tiene al trabajar con animales es diverso pueden ser ocasionadas por parásitos o bacterias ya sea por mordidas, rasguños o por contacto directo con elementos contaminados. Dentro de algunos agentes podemos mencionar: *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Pasteurella*, *Brucellacannis*, *Cryptosporidium*, *Toxoplasma gondii*.

Otro riesgo son las alergias, pues se está expuesto de forma constante a pelos, ácaros de los animales y polvo de materiales que manejamos en el trabajo diario.

Los riesgos químicos pueden ser debido a la anestesia inhalatoria, la ingestión accidental de insecticidas organoclorados y organofosforados, el contacto con quimioterápicos u hormonas.

Bienestar del gato y del perro como animales de laboratorio

El desarrollo comportamental de estas especies es fundamental y se produce en las primeras 12 semanas de vida aproximadamente. Aquí la sociabilización (con personas y con otros animales), el aprendizaje temprano, el conocimiento y el confort en distintos ambientes es importante. Para esto se debe contar con buenas instalaciones, personal entrenado que esté presente, no sólo para alimentar y limpiar, si no para jugar, acariciar, levantar y observar los animales con un mínimo de 30 minutos por día. Un buen plantel veterinario y programas de sociabilización y entrenamientos para futuras maniobras es fundamental. El medio les debe brindar la posibilidad de estar expuestos a una diversidad de objetos, texturas, estructuras, sonidos, olores, movimientos de personal. Ambientes que provean a los animales desde pequeños diversas situaciones los ayudará a transitar los cambios y nuevas experiencias sin demasiado estrés (Hubrecht, 2010ab).

En el caso de los perros la sociabilización es crítica en los cachorros hasta las 12 semanas de vida, pero a su vez esta se debe reforzar ya que los individuos adultos pueden mostrar una regresión en el comportamiento. La separación de los cachorros de sus madres debe ser de forma paulatina en ambientes que sean conocidos para ellos (Hubrecht, 2010a).

El gato es un animal sociable, que le gusta poder ver o estar en contacto con sus congéneres o su cuidador. La sociabilización comienza en edad temprana entre la segunda y hasta la octava semana de vida, en este período es muy importante que en el medio donde se desarrollan reciban un correcto estímulo. Es fundamental el juego con otros gatitos, el contacto con otras especies e inclusive con el ser humano. Para una mejor sociabilización con las personas se recomienda que sean varias personas las que jueguen con ellos, de lo contrario el animal se apegará a una sola persona y dificultará la manipulación posterior. Los comportamientos de aseo, eliminación y alimentación, tienen un componente innato, sin embargo, si la madre les enseña aprenden más rápido. La comunicación para con el resto será a través de sonidos, vocalizaciones, posturas corporales y olores. Los machos enteros son más agresivos entre sí, por lo que se debe evitar tener dos machos adultos en

el mismo grupo. Las hembras pueden vivir en grupo, son menos agresivas entre sí aunque los cambios constantes alteran el orden y aumentan las peleas. Los machos pueden formar un harem con hasta 20 hembras (Meunier, 2014).

Cuando los animales llegan al bioterio es importante que sean alojados en salas de cuarentena donde se los podrá observar por posible desarrollo de una enfermedad y a su vez se los podrá adaptar a la rutina y dieta. En este momento de adaptación es importante que el personal dedique tiempo extra para que los animales puedan habituarse al manejo y confiar en el personal. En el caso de los gatos esta situación puede ser muy estresante, por lo tanto, los tiempos de adaptación, al personal primero y a sus congéneres después, puede ser de semanas.

En el caso de los perros las situaciones de encierro y estrés pueden aumentar los ladridos y con ello aumenta de ruido del bioterio. Para evitar esto puede ser de utilidad favorecer una mayor posibilidad de interacción con otros individuos, ya sea física o visual. En el caso de los gatos necesitan más espacio entre ellos independientemente de su tamaño, lo ideal es que entre un individuo y otro haya 2 a 3 metros. Además de brindar ventanas y estantes con almohadones, alfombras o frazadas, para que puedan pasar gran parte de su tiempo elevados del suelo mirando al exterior (pueden pasar el 60% de su tiempo en estos lugares). A su vez se les debe proveer lugares y objetos para que puedan esconder y brindar la posibilidad de separarse del resto del grupo si así lo desean (Meunier, 2014).

Para el enriquecimiento ambiental se pueden utilizar distintos juguetes u objetos lo importante es que los animales puedan divertirse con ellos y esto va a variar entre especie y entre individuos. Estos objetos deben ser seguros, no tóxicos, no debe dañar a los animales, de material resistente, fáciles de limpiar y desinfectar, que a su vez ayuden al animal a desarrollar actividades de búsqueda, cacería; lo importante es que ocupen gran parte de su tiempo en algo positivo. En el caso de los perros elementos para morder pueden ser de utilidad y en el caso de los gatos elementos que se deslicen y puedan atrapar. Por otro lado, el enriquecimiento puede ser sonoro (radio, música), con olores para que busquen, o puede ser interactivo con el personal como pelotas para que atrapen.

Una vez finalizados los protocolos experimentales los animales pueden ser reubicados con familias. Ambas especies si han sido bien sociabilizadas pueden adaptarse a los nuevos ambientes con su familia adoptante; hay estadísticas que demuestran que aproximadamente más del 90% de los animales dados en adopción continúan con sus familias adoptivas después de un período de seis años (Meunier, 2014).

Referencias

Hubrecht R, Kirkwood J (2010a). The Laboratory animal Dog in The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals, Eighth Edition, 432-452.

- Hubrecht R, Kirkwood J (2010b). The Laboratory animal Cat in The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals, Eighth Edition, 453-472.
- Meunier LD, Beaver BV (2014). Dog and Cat Welfare in a Research Environment. *Laboratory Animal Welfare*, 213–231.
- Zúñiga JM, Muriana JM, Tur JA (2008). Ciencia y tecnología del animal de laboratorio: formación avanzada de postgrado. Universidad de Alcalá de Henares.

CAPÍTULO 18

El cerdo como animal de experimentación

Guido Mariano Príncipi

Introducción

Desde la domesticación el cerdo ha sido un eslabón esencial dentro de las culturas y costumbres del ser humano. Su utilización como alimento y la obtención de subproductos tuvo y tiene un rol importante para el desarrollo de la humanidad.

Tanto el cerdo comercial como los cerdos miniaturas utilizados para investigación y como mascotas, corresponden al *Sus Scrofa Doméstica*. El cerdo doméstico presenta similitudes con el ser humano tanto en sus hábitos alimenticios como en la conformación de órganos y sistemas. A su vez presenta similitudes anatómo-fisiológicas. Todas estas características motivan su utilización como modelo animal de muchos estudios. Asimismo, por su importancia comercial, ha sido objeto de estudios relacionados con su fisiología, su curva de crecimiento, la nutrición, la sanidad y la bioseguridad entre otros. La genética se ha desarrollado de la mano de las líneas híbridas, producto del cruzamiento de las razas más importantes, con el propósito de mejorar su rendimiento en producción y reproducción. Por otro lado, también se ha trabajado en la selección y desarrollo de líneas miniatura o minipigs, tanto para uso en investigación como para su aprovechamiento como mascotas. En cuanto a la nutrición, que es el insumo más costoso de la producción, las investigaciones se orientan con el objetivo de eficientizar los costos productivos y disminuir la eliminación de excretas contaminantes. Todas estas características relevantes hacen de esta especie un modelo animal trasposable al ser humano. (Bollen 2010).

En países desarrollados donde la cría de cerdos tiene una gran relevancia económica, se han promulgado programas de acompañamiento para las granjas comerciales, para promover calidad, sanidad y bienestar animal. Estos programas de calidad posibilitan la utilización de cerdos comerciales de alto status sanitario como fuente de provisión de animales para investigación.

A manera de ejemplo podemos mencionar el sistema de Canadá donde en el año 2005 el Canadian Pork Council (CPC) a través del programa de Animal Care Assesment (ACA) promueve una producción porcina responsable, primando el bienestar animal. Este programa impulsa los programas de calidad agroalimentaria ya existentes como requisito para la producción. Por otro lado, en las guías de cuidado y uso de animales de experimentación de Canadá, EEUU y Unión Europea se incluyen, dentro de los animales de granja, las recomendaciones para el uso y el cuidado del cerdo en investigación

Asimismo, hay guías regulatorias para el cerdo tanto para estudios biomédicos (Public Health Service, 1996) como para investigación agropecuaria (Committees to Revise the Guide for the Care and Use of Animals in Agricultural Research and Teaching, 1999).

Historia y evolución

El cerdo doméstico deriva de dos especies; *Sus scrofa*, que es el cerdo europeo y *Sus vittatus*, que es el cerdo salvaje del este y sudeste de Asia. Estos jabalíes que existen aún, se alimentan con pequeños animales, tubérculos, frutos y pastos nativos; tienen desarrollados sus colmillos para defensa, como el tren anterior y el tórax que junto con el cuerpo corto les permite alcanzar buena velocidad y agilidad para huir de animales mayores. Su cabeza es pesada e insertada firmemente. El cerdo original vivió en forma sedentaria alrededor de los pueblos y posteriormente el hombre lo confinó y empezó a alimentarlo. (Espinoza et. al. 2005).

En el transcurso de los tiempos se llegó a un animal voluminoso de gran papada, tórax estrecho, articulaciones cortas, pero gruesas y que albergaba grandes cantidades de grasa.

Desde su domesticación hasta nuestros días el cerdo sufrió grandes modificaciones morfológicas y fisiológicas, debido a las diferentes condiciones en que vivió y al aprovechamiento que ha hecho el hombre de esta especie. Así pasó de un animal graso para aprovechamiento del unto a un animal magro para consumo de carne, logrado mediante cruzamientos y mejoramientos genético, mejores condiciones de alimentación, excelentes instalaciones y en general un manejo óptimo.

El cerdo en experimentación animal

Muchas investigaciones han puesto de manifiesto que el cerdo se parece anatómica y fisiológicamente al ser humano. Su parecido anatómico gastrointestinal y de hábitos alimenticios ha permitido su uso para estudios de gastroenterología. De hecho y durante mucho tiempo fueron modelo casi exclusivo en la evaluación de los efectos de la dieta sobre los sistemas fisiológicos. A su vez es omnívoro, consume una dieta similar a la humana, mastica de la misma manera, posee dientes similares a los de los humanos y comienza la digestión en un estómago simple, que, además, es susceptible a úlceras.

También son utilizados en el campo de la investigación quirúrgica, por sus condiciones anatómicas, principalmente en el entrenamiento de trasplantes de órganos (corazón, páncreas, riñón, hígado), técnicas endoscópicas y laparoscópicas. Además, se los utilizaron en xenotrasplantes, por reemplazo de tejidos en humanos, los cuales presentan el inconveniente de mostrar rechazo, por lo que preservación de los órganos también puede resultar un problema. Sin embargo, sigue siendo motivo de investigación el uso de tejidos de cerdo en humanos como paliativo de curaciones que demandan tiempo de evolución.

Su piel ha sido ampliamente estudiada en ensayos de cirugía plástica reconstructiva y en estudios de fisiopatología, por ser más similar a la humana que la de otras especies.

Cabe destacar que poseen valores hematológicos y un grado de desarrollo al nacer similar al humano, resultando un buen modelo de estudio de estas áreas temáticas.

En cuanto al sistema digestivo, se lo emplea en estudios de dentición, obesidad o úlceras gastroduodenales.

Por lo expuesto el cerdo es utilizado en distintos campos de investigación como dermatología, hematología, trasplantes, cirugía experimental, alcoholismo, diabetes metabolismo, odontología, radiaciones cutáneas, deficiencias de vitaminas, toxicología y gastroenterología entre otros; además de ser un modelo preclínico para la prueba de productos farmacéuticos y dispositivos biomecánicos. (Smith 2006).

Asimismo, se lo usa mucho en estudios referentes al corazón, incluyendo cirugía cardiovascular experimental, enfermedades cardiovasculares: aterosclerosis, hipercolesterolemia, circulación coronaria, conducción miocárdica, electrocardiografía, infartos y anomalías congénitas.

La anatomía renal resulta la más similar a la de los humanos comparada con otros modelos animales de uso común, explicando su uso para cirugía intrarrenal, hidronefrosis e hipertensión renal. (Smith 2006).

No obstante, existen varios inconvenientes con uso de estos animales. Su carácter potencialmente agresivo y el tamaño adulto que puede dificultar su manejo. Además, también existe un rechazo cultural en muchas regiones, entre otras razones por creencias religiosas, por resultar un potencial transmisor de enfermedades al hombre, o simplemente por proteccionismo.

En cuanto a su manejo es un animal que se adapta fácilmente a la mayoría de los climas, aunque presenta ciertas características a resaltar. Al nacer están desprovistos de pelo, muy bajas reservas de grasa subcutánea y glucógeno hepático, lo que resulta en una deficiente capacidad de termorregulación y consecuente susceptibilidad a las bajas temperaturas. El lechón al nacimiento necesita un ambiente con temperatura focal de alrededor de 32 a 33 °C. A medida que se van desarrollando la ecuación se invierte y los animales adultos soportan mucho menos las altas temperaturas, porque sus glándulas sudoríparas son escasas y apocrinas, y su principal eliminación de calor se produce por ventilación. Por este motivo a medida que crecen son más importantes sus exigencias en cuanto a ambientes ventilados, con temperaturas confort que no superen los 21 °C. (Campagna et al 2010).

En general, se recomienda más espacio para los cerdos de investigación que para los porcinos en la agricultura mejorando los comportamientos específicos de la especie y minimizando los comportamientos inducidos por el estrés. A su vez requieren enriquecimiento ambiental para satisfacer su intensa necesidad de masticar. La cama de paja o la viruta de madera son excelentes elementos de enriquecimiento, aunque pueden dificultar la higiene adecuada de la jaula,

Reproducción

Las cerdas son poliéstricas continuas y politocas, con camadas numerosas. Tienen un ciclo que dura promedio 21 días entre celo y celo, y este puede durar entre 2 y 3 días, y la ovulación ocurre durante el último tercio del mismo aproximadamente a partir de las 60 horas de inicio del celo. (Fernández et al 2016.)

La signología de celo se exhibe con la vulva inflamada, tumefacta y enrojecida, sin embargo, el principal signo es el reflejo de inmovilidad ante la presencia del macho o ante la presión en la zona lumbar.

La gestación dura 114 días +/- 1. La placenta es de tipo epiteliocorial, conteniendo 6 capas, por lo que la inmunidad pasiva del lechón se produce por la ingesta de calostro durante las primeras horas de nacido donde el intestino es permeable a las inmunoglobulinas hasta que ocurre el cierre intestinal alrededor de las 20 hs. de vida.

Dentro de las primeras 48 hs. de nacidos pueden realizarse adopciones cruzadas entre madres que hayan parido al mismo tiempo para equiparar camadas o utilizar madres nodrizas.

Por la incapacidad de termorregular y su susceptibilidad a ambientes fríos, los lechones neonatos se colocan con fuentes focales de calor como mantas térmicas, lámparas infrarrojas o estufas; o en su defecto busquen el calor de la madre con mayor riesgo de muerte por aplastamiento.

Entre las maniobras que se le realizan al lechón podemos mencionar las que corresponden al momento del parto y las que se realizan durante la lactancia.

Al momento del parto

Secarlos con toallas o polvo secante.

Despejar las vías aéreas.

Ligadura, corte y desinfección del cordón umbilical.

Calostrado en las primeras horas.

Pesaje.

Colocarlos en fuente de calor.

Durante la lactancia

Administración de hierro dextrano para evitar anemia ferropénica.

Descolmillado, Descole, Desparasitación al día 3, en caso que se realicen.

Castración en los casos que se realice, a partir del día 7 de vida.

Creep feeding o alimentación con papilla al pie de la madre a partir del día 10/12 de vida.

Destete a los 21 o 28 días.

Instalaciones

Como ya mencionamos el cerdo es un animal de interés comercial principalmente por su carne. El uso de tecnologías adaptadas a la especie ha ido mejorando a lo largo de los años para expresar el potencial de la especie, brindar bienestar animal, garantizar bioseguridad y facilitar las tareas y el desempeño del personal. Es así que los laboratorios pueden proveerse de animales de granja con status sanitario conocido para experimentación. Las condiciones de alojamiento que brindaremos en el laboratorio son similares a las que se utilizan en granja y van a depender de la categoría animal con la que trabajemos.

En los sistemas productivos podemos distinguir 2 tipos de producciones, la confinada a galpón y los sistemas al aire libre.

Los sistemas confinados consisten de galpones adaptados a las condiciones medioambientales de cada categoría animal. Las categorías se ubican en sitios denominados I, II, III. El sitio I alberga todo el plantel reproductivo y está compuesto por un lado por galpones de gestación, en los cuales vamos a encontrar: hembras en servicio y gestantes, padrillos y cachorras de reposición. Por otro lado, se encuentran los galpones de maternidad con las hembras en periodo de lactancia con sus camadas.

En sitio II corresponde al periodo de destete y recría que va de los 6 a 9 kg de peso hasta los 30 kg de peso promedio aproximado. En este caso son animales jóvenes provenientes del destete de la maternidad, que aún mantienen ciertos parámetros y control especiales de temperatura en el galpón.

El sitio III son los galpones de desarrollo y terminación que va desde los 30 kg hasta obtener el producto final de 100 a 120 kg de peso. En este caso los galpones se asemejan a las necesidades de un animal adulto de sistemas de ventilación adecuados y evitar las altas temperaturas.

Estos sitios en granjas de alta bioseguridad deben estar separados al menos por 3000 metros entre sí.

Las granjas de Genética proveen de hembras reproductoras y padrillos a las granjas comerciales. En general estas empresas deben ser de alta bioseguridad y proveen animales muy controlados sanitariamente. Por este motivo pueden proveer animales a laboratorios de status microbiológico conocido.

El cerdo de laboratorio

En investigación además del cerdo de producción de granja existe la alternativa de los cerdos miniatura de los cuales hay líneas específicas para investigación y razas miniatura que además se utilizan como mascotas.

El cerdo de producción alcanza la madurez sexual con más de 100 kg lo que puede dificultar su manejo. Su peso adulto puede superar los 250 kg. Estas características pueden condi-

cionar su uso en investigación sobre todo por el alojamiento en laboratorios y manejo. Los cerdos miniatura dependiendo de la línea o la raza pueden alcanzar su madurez sexual con 10 a 45 kg y un peso adulto entre 15 y 70 kg. Los más utilizados en investigación son el Yucatan Miniatura, Hanford, Gottingen, Sinclair S I. También existen líneas o razas utilizadas como mascota como los Panepinto, Osabaw, Banna, Ohmini, Pitman-Moore, Chinese Dwarf y Vietnamese potbellied. (Swindle 2007).

La Universidad de Gottingen en Alemania desarrolló la línea de minipigs Gottingen en los años 1960 a través del cruzamiento del Minnesota Minipig, con el Vietnamese Potbelly Pig y el landrace alemán, combinando el tamaño pequeño del primero con la fertilidad del segundo y el fenotipo blanco del tercero. Hoy la compañía Gottingen Minipigs ofrece estos cerdos para investigación en Europa y EEUU. Corresponde a un cerdito de capa blanca cuya madurez sexual en machos es a los 3-4 meses con 7 a 9 kg y las hembras entre 4-5 meses con 9 a 11 kg de peso) Animales que a los 2 años pesan alrededor de 35 kg. Criados en bioterios especiales para ofrecer estos animales como reactivo controlado de colonias cerradas para investigación biomédica. (Reimer, 2020). Los laboratorios Charles River, Sinclair, NIH también ofrecen marcas registradas de cerdos miniatura para investigación

Ambiente

Las instalaciones para cerdos de investigación deben brindar confort y respetar los requerimientos ambientales de la especie a la vez que sustentar su bienestar.

Las superficies internas deben ser fabricadas con materiales lisos y no porosos, fáciles de limpiar y desinfectar. Los comederos y los tabiques divisores de los corrales, no deben tener aristas puntiagudas o protuberancias que puedan ocasionar heridas a los animales. Los pasillos y los pisos de los corrales deben tener desagües eficaces. Todos los pisos, hechos de material sólido, de tablillas, o de alambre, deben favorecer un paso adecuado y no provocar heridas para los cerdos. Los animales destetados, que pueden colocarse en grupos, donde tienden a armar jerarquías sociales.

El piso más adecuado principalmente a temprana edad corresponde al enrejillado plástico ya que es el material más confortable, soporta bien el peso, y las excretas caen a una fosa inferior. Si utilizamos piso ciego con pendiente debemos colocar menor densidad animal, y la limpieza es diaria; en estos casos el agregado de viruta blanca o paja ayuda al bienestar de los animales. Los cerdos suelen seleccionar un sector para orinar y defecar; y otro para descanso por lo que se requiere de un espacio mínimo por animal para cada categoría.

Los cerdos adultos requieren de 17 a 21°C de temperatura confort.

La ventilación debe ser adecuada evitando las corrientes de aire sobre todo en las edades tempranas.

No es factible establecer valores específicos relativos a parámetros del ambiente, tales como la temperatura, humedad y ventilación, que se apliquen a todas las clases de cerdos y en

todas las situaciones posibles de la investigación y la enseñanza. Los requerimientos particulares variarán considerablemente con la edad, el tipo de alojamiento, la densidad de población, etc.; las márgenes mencionadas, en la mayoría de los casos, se refieren a los límites superiores e inferiores de las zonas de confort generalmente aceptadas.

Temperatura

Con excepción de los recién nacidos y de los lechones lactantes, los cerdos se adaptan muy bien y están cómodos en una gran variedad de condiciones climáticas, siempre que se les provean instalaciones apropiadas que les permitan conservar o eliminar el calor del cuerpo. Los animales alojados al aire libre deben disponer de un espacio sombreado, preferentemente húmedo, para que puedan estirarse en el suelo y eliminar su calor corporal por conducción. El confinamiento total, sobre pisos de cemento, o sobre enrejados, puede interferir con la transferencia de calor por conducción. Los sistemas de soporte ambientales deben ser adecuados para mantener una zona de confort satisfactoria a lo largo del año. El agregado de cama en algunos sistemas crea un micro ambiente cómodo para los animales.

Los cerdos mayores de 30 kg y adultos tienen un rango de temperatura confort similar que va desde los 15 a los 25°C. Este rango va a depender del tipo de instalaciones o sistema de alojamiento individual o grupal y de la cantidad de animales alojados. Aunque soportan temperaturas extremas de 10°C o menos, y hasta 30 °C. Por encima de los cuales puede poner en riesgo su supervivencia. (Campagna, D. 2012).

El área de parto presenta una dificultad especial porque los requerimientos ambientales para la cerda y los recién nacidos son completamente diferentes. Para la comodidad de la cerda, se debe mantener una temperatura entre 15-21°C, mientras que el área para los lechones debe ser siempre seca, protegidos de corrientes de aire y mantenidos a una temperatura alrededor de los 32/ 33 °C en los primeros días. Este se consigue con calor focal como ya mencionamos.

Ventilación y humedad

Los cerdos adultos y en crecimiento se desenvuelven muy bien en ambientes a donde la humedad relativa varía entre los 40-80%, Existen sistemas de ventilación natural y artificial. La natural es por cortinas y la artificial por ventiladores o extractores. Asimismo, existen sistemas de enfriamiento para climas cálidos por paneles evaporativos o por pulverizadores de neblina. En espacios chicos como laboratorios, con pocos animales alojados se puede instalar aire acondicionado. Es recomendable para espacios cerrados 10 a 15 recambios totales de aire por hora.

Ruido y olores

Algunos ruidos y olores están inevitablemente presentes en cualquier criadero y pueden ser perjudiciales. Se pueden reducir al mínimo los olores con una limpieza eficaz, regular y una ventilación adecuada. Se puede mantener el nivel de ruido, asegurándose que el equi-

po mecánico opere relativamente suave, y minimizando los procedimientos que perturban a los animales.

Alimentación

El alimento se diferencia según la etapa productiva basado en los requerimientos. Existen tablas de requerimientos para diferentes etapas y en diferentes condiciones de alojamiento, como las tablas NRC de estados unidos, Fedna de Europa y las brasileñas de Rostagno.

El alimento se administra ad libitum en animales de crecimiento y cerdas de lactancia y restringido en hembras gestantes y padrillos según su condición corporal. La alimentación es principalmente sólida en forma harinas de 400 a 800 micras de partícula a base de granos cereales y subproductos de la industria oleginosa. También puede utilizarse líquida, la que implica instalaciones totalmente diferentes para su provisión. El agua se brinda ad libitum por bebederos tipo chupete.

Cama

Cuando se alojan cerdos en instalaciones pequeñas durante períodos cortos, se puede utilizar paja u otro material adecuado. No se usa cama en las instalaciones más grandes, donde la limpieza y la evacuación del estiércol se hacen automáticamente. Se debe proveer una cama de paja espesa, cuando los cerdos están mantenidos en establos o al aire libre.

Manejo, sujeción, extracción de sangre y vías de administración

Los animales adultos son difíciles de manejar, salvo que estén alojados en jaulas. Para sujetarlos hay enlazar su maxilar superior por detrás de los colmillos, teniendo especial cuidado con estos sobre todo en padrillos porque pueden resultar cortantes.

Lechones jóvenes de menos de 5kg pueden inmovilizarse por las patas traseras y transportarse con ambos brazos

Lechones mayores de 5 kg se colocan un brazo por debajo de tronco y abdomen y con el otro se sostiene la cabeza inclinada hacia atrás.

Para extracción de sangre en animales hasta 20 kg aproximados, se necesitan 2 operarios, 1 para sujetarlos y colocarlo en decúbito dorsal y con la cabeza estirada hacia el piso. Otro realiza la extracción. La maniobra más sencilla es acceder a la vena cava craneal, que no es visible en esta especie. La punción se realiza ingresando con la aguja en dirección caudomedial en el espacio triangular que se forma entre el manubrio del esternón, la articulación del encuentro y la primera costilla del lado derecho del animal, insertando la aguja de manera caudomedial hacia el hombro opuesto.

En animales mayores sujetados por el maxilar superior en estación, la extracción puede realizarse en las venas de la oreja con el inconveniente que son muy lábiles y brindan poco volumen de sangre o en la vena cava ingresando del lado derecho perpendicular al cuello en direc-

ción algo caudal en la gotera que se forma en entre el manubrio del esternón y la articulación del encuentro con el animal sujeto en estación con la cabeza inclinada hacia arriba. También puede utilizarse la vena coccígea, la yugular y acceso arterial a la femoral. Es importante el entrenamiento del personal para realizar estas maniobras con personal idóneo

Los cerdos reaccionan al dolor con cambios en su paso y postura. Normalmente, chillan e intentan escapar cuando los manipulan; sin embargo, estas reacciones pueden acentuarse cuando el animal está con dolor. Los cerdos adultos pueden llegar a ser agresivos.

El chillido es característico cuando se palpan zonas dolorosas, pero no parecen sufrir cuando se palpan lesiones crónicas. Frecuentemente, están poco dispuestos a moverse, y cuando pueden, optan por esconderse en su cama de paja. Son perjudiciales los claroscuros al moverse y prefieren paredes ciegas y pisos no resbaladizos con poca pendiente (Grandin T. 1997).

Vías de administración

La administración de sustancias puede realizarse por vía subcutánea, intramuscular, endovenosa e intraperitoneal.

La vía subcutánea ideal es en piel laxa por detrás de la oreja. Los animales adultos tienen una capa de grasa subcutánea que facilita el acceso a esta vía ya que se necesitan agujas largas (40 o 50mm) para ingresar a la vía muscular. Esta última puede utilizarse en los músculos del cuello detrás de la oreja o en los músculos de los miembros posteriores con agujas largas.

Cerdo SPF y DPF

Los cerdos, al igual que otros animales de laboratorio, se pueden producir de acuerdo con cuatro niveles de cuidados: convencionales, SPF, libres de gérmenes o axénicos y gnotobióticos. Los axénicos y gnotobióticos se obtienen mediante procedimientos quirúrgicos, derivándolos por cesárea y se mantienen bajo aislamiento. Estos se pueden inocular con un microbiota conocido. Estos animales son costosos y difíciles de mantener y en general, no están disponibles comercialmente. Los SPF, en cambio, se producen mediante las mismas técnicas y se mantienen libres de agentes patógenos específicos de la especie. Estos cerdos se compran para progenitores y se mantienen en instalaciones convencionales. Si bien ellos pueden usarse para investigaciones y ensayos, en especial los que pesan hasta 35 kilos que se usan para estudios agudos y subcrónicos, se producen con interés en la producción porcina

En los Estados Unidos la Agencia Nacional SPF acredita las granjas que producen cerdos comerciales, realiza inspecciones periódicas y controla las instalaciones y el estatus sanitario de los animales (Safron y col 1997).

Los cerdos Designados Libres de Patógenos (DPF) son animales que se obtienen mediante técnicas gnotobiológicas, se alojan en instalaciones especiales, siempre en el interior, sin ventanas con aire filtrado y bajo presión positiva, recambios de aire, con control de temperatura y humedad, y cuidados por personal capacitado que asegura su condición sanitaria y su bienestar.

Estos cerdos son fuente de células que se usan para xenotransplantes, lo cual demuestra las estrictas condiciones bajo las cuales se los produce y mantienen. Los bioterios en los que se alojan estos cerdos se rigen en cuanto a las condiciones edilicias, de manejo y uso por la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los EEUU, que son las mismas que se usan para ratones y ratas (Shuurman H. 2009)

Anestesia

Los cerdos deben ayunar 12 horas antes de la cirugía para prevenir el vómito, pero pueden tomar agua hasta que se les administre un pre-anestésico. La anestesia epidural también es de uso común. La ketamina combinada con la xylazina, el diazepam, la acepromazina o el fentanil/droperidol, producen buenos resultados como anestésicos generales. La combinación tiletamina/zolazepam tiene buenos resultados. Los barbitúricos se usan generalmente solo combinados con un sedativo. Los anestésicos por inhalación se toleran bien y se puede hacer fácilmente la inducción en cerdos pequeños con una máscara. La intubación de la tráquea es difícil por razones anatómicas, y en este caso es aconsejable vaporizar lidocaína sobre las cuerdas vocales para prevenir espasmos de la laringe. Existen cerdos sensibles al halotano, asociados a la raza Pietrain, Landrace belga y sus cruza que ante la exposición al gas manifiestan espasmos musculares, temblores y aumento de la temperatura del denominado síndrome de estrés porcino o hipertermia maligna. Por este motivo suelen elegirse otros anestésicos inhalatorios (Fleknel 1998) (Swindle 2007)

Eutanasia

Lo más utilizado es la sobredosis de anestesia con barbitúricos o la utilización de cloruro de potasio en animales con anestesia profunda. En animales de producción se usan cámaras de CO₂, o noqueo por electrocución o bala cautiva, estos dos últimos seguidos de exanguinación o sangría, no son métodos utilizados en investigación salvo que estén evaluados y aprobados por un comité.

Referencias

- Bollen, PJ, Hansen, AK y Alstrup, AKO (2010). *El cerdo de laboratorio*. Prensa CRC
- Campagna, D. A., & Somenzini, D. (2010). *Producción porcina en Argentina: instalaciones y equipos*.
- Campagna, D. 2012. Capítulo V. Instalaciones. En Brunori, J., Fazzoni, R., & Figueroa, M. E. (2012). *Buenas prácticas pecuarias para la producción y comercialización porcina familiar* (No. Q02/4). Ministerio de Agricultura de la República Argentina, Buenos Aires (Argentina) FAOINTA.
- Espinoza, C., & Castaño, G. (2005). Manual de producción porcícola.
- Fernández V, Barrales H, Compagnoni M., Williams S. 2016. Sección III, CAPÍTULO 33. *Fisiología del Ciclo Estral de la Cerda*. En Stornelli, M. A., & Sota, R. L. D. L. (2016). Manual de reproducción de animales de producción y compañía. Series: Libros de Cátedra.
- Flecknell, PA (1998). Laboratorio de anestesia animal. Una introducción para Investigadores y técnicos. España: Acribia
- Grandin, T. (1997). Evaluación del estrés durante el manejo y transporte. *J Anim Sci*, 75, 249-257.
- Reimer, C., Ha, NT, Sharifi, AR, Geibel, J., Mikkelsen, LF, Schlather, M., ... y Simianer, H. (2020). Evaluación de la integridad de la raza de Göttingen Minipigs. *Genómica de BMC*, 21, 1-13. <https://minipigs.dk/https://www.nfacc.ca/codes-of-practice/pig-code>
- Safron, J Gonder J. The SPF pig in research *ILAR Journal*, Volume 38, Issue 1, 1997, Pages 28–31, <https://doi.org/10.1093/ilar.38.1.28>
- Smith, AC y Swindle, MM (2006). Preparación de cerdos para el laboratorio. *Revista ILAR*, 47 (4), 358-363.
- Stricker-Krongrad, A., Shoemaker, C. R., & Bouchard, G. F. (2016). The miniature swine as a model in experimental and translational medicine. *Toxicologic pathology*, 44(4), 612-623.
- Swindle, M. M. 2007. *Swine in the laboratory: surgery, anesthesia, imaging, and experimental techniques* -- 2nd ed. ISBN-13: 978-0-8493-9278-8
- Swindle, MM y Smith, AC (Eds.). (2015). *Porcinos en el laboratorio: cirugía, anestesia, imagenología y técnicas experimentales*. Prensa CRC.
- Schuurman Henk-Jan Xenotransplantation, Volume 16, Issue 4 Pages: 193-262
Chapter 2: Source pigs , 2009 <https://doi.org/10.1111/j.1399-3089.2009.00541.x>

CAPÍTULO 19

Peces como animales de experimentación

Juan Martín Laborde

Introducción

La utilización de los peces como animales de experimentación se conoce desde hace mucho tiempo, y se evidencia un incremento notable en los últimos años debido al desarrollo y aplicación de modelos transgénicos que los posicionan en alternativas de elección de vertebrados para realizar estudios en reemplazo de especies tradicionales. En la actualidad el uso de los peces está orientado a las investigaciones biomédicas y ambientales y por lo tanto es importante elaborar directrices que sean útiles para el investigador principal y el personal responsable del cuidado, cría y manejo de los peces, como también de ayuda a los miembros de los Comités Institucionales de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUALes) cuando se evalúen protocolos en los que se usen estas especies.

Durante los últimos 10 años, el uso de peces en la investigación ha ido en aumento debido a la amplia gama de posibilidades para utilizarse como modelos animales por sus propiedades biológicas particulares. También ha aumentado la concientización sobre la salud de los mismos como un factor que afecta al medio ambiente y como agentes indicadores de contaminación ambiental, de manera que la investigación sobre los peces y, más específicamente, la investigación en acuicultura permite abordar cuestiones relacionadas con la contaminación ambiental, la conservación y la protección del medio marino y de estuarios de agua dulce (Canadian Council on Animal Care, 2005; Håstein y col., 2005; Spence y col., 2008).

Origen del pez como animal de laboratorio

Los orígenes de la utilización de peces como animales de laboratorio datan del año 1970 cuando los mismos comenzaron a ser utilizados como indicadores de contaminación acuática en diversos países de Europa. Posteriormente el pez cebra fue la especie elegida para realizar el 80% de las investigaciones con esta especie. La investigación con peces en la ciencia de animales de laboratorio explora y utiliza su increíble diversidad dentro de las 20.000 especies existentes en todo el mundo las que constituyen alrededor de la mitad de todas las especies

vivas de vertebrados, lo que los convierte en el mayor grupo de vertebrados vivos del planeta (Håstein y col., 2005; Spence y col., 2008).

Biología, taxonomía y características anatómicas

Los peces son animales de sangre fría (ectotermos = poiquilotermos), caracterizados por poseer vértebras, branquias y aletas. Dependen fundamentalmente del agua, que es el medio donde viven. Su origen se remonta al período Devónico, hace 300 millones de años.

Los peces se clasifican en tres grandes grupos: Placodermos: son peces acorazados, especies arcaicas ya extinguidas. Condroictios: peces cartilagosos como es el caso de rayas, tiburones, etc. Se caracterizan por tener esqueleto cartilaginoso, piel recubierta por escamas placóideas (con una placa en la base y una espina saliente), poseer de cinco a siete pares de branquias separadas por laminillas branquiales (por eso también se los denomina elasmobranchios; elasmo = laminilla), aleta caudal con un lóbulo mayor que el otro y la boca provista de varias series de dientes, muy duros y puntiagudos, que son reemplazados por los anteriores cuando estos se caen por el uso. Osteictios: Peces óseos (teleosteos), son los más numerosos y complejos, y donde ya se han clasificado más de 20.000 especies. La mayoría de ellos se encuentran actualmente poblando las aguas continentales y marítimas. Entre las características sobresalientes de los peces óseos se destacan las siguientes:

- Son vertebrados acuáticos de esqueleto óseo.
- Respiran por medio de branquias
- Tienen la piel recubierta por escamas.
- Presentan un sistema circulatorio simple.
- Poseen aletas de diversas estructuras y formas.
- Su reproducción es generalmente externa.
- Son animales poiquilotermos.
- Tienen vejiga natatoria.

La anatomía de los peces se encuentra condicionada por dos grandes factores que inciden sobre su existencia, por una parte el medio acuático, y por otra la condición de animales poiquilotermos (Canadian Council on Animal Care, 2005; Håstein, 2005).

El bienestar animal

Para realizar cualquier investigación con peces como modelo animal se recomienda que se provea un ambiente apropiado y asesoramiento de expertos sobre el ambiente y comportamiento de las diferentes especies. Los principios sobre bienestar animal no incluyen a los peces ni a ninguno de los vertebrados de sangre fría, pero se pueden tener en cuenta varios de

sus preceptos como seleccionar especies animales que sean apropiadas para la investigación, condición sanitaria requerida, así como usar el número mínimo de animales suficientes para obtener resultados válidos y confiables. También deben considerarse alternativas no animales a fin de evitar malestar, angustia o dolor y estar en concordancia con los principios propuestos en las tres “Rs” de Russel y Burch.

Las condiciones de cautiverio deben contribuir con la salud y el bienestar del animal. Los peces deben ser atendidos por personal capacitado y experimentado, incluido el cuidado veterinario, como también los investigadores ser estrictamente calificados y acreditar experiencia y formación suficiente antes de iniciar investigaciones con animales (Canadian Council on Animal Care, 2005; Håstein y col., 2005; Spence y col., 2008).

Procedimientos de desarrollo para la producción de peces

Macroambiente y microambiente

Instalaciones

Existen más de 20.000 especies de peces que viven bajo condiciones ambientales diferentes, por lo tanto, la cría variará dependiendo del ambiente natural para cada especie en particular. Los sistemas de alojamiento deben ser preparados y aclimatados antes de recibir animales. Durante la construcción, es necesario proporcionar el espacio adecuado y considerar la calidad del agua. Si se utiliza un suministro de agua de red urbana, esta debe ser libre de cloro, lo cual se logra mediante la aireación de la misma o por filtración a través de carbón activado o compuestos que precipitan el cloro, tales como tiosulfato de sodio. Toda el agua debe analizarse antes de su uso y tiene que poseer los niveles apropiados de pH, amoníaco, nitrato y calcio en el medio acuoso. Los sistemas de producción de peces de laboratorio incluyen acuarios estáticos o con circulación cerrada de agua; también en estanques o lagos con una red o jaula colocada en el cuerpo de agua en los que puede existir una circulación abierta de provisión de la misma. Los dos primeros métodos se utilizan comúnmente en los laboratorios de investigación de peces y tienen muchas ventajas sanitarias por lo que se recomiendan, aunque los equipamientos de estanques pequeños separados y recirculación de agua son muy costosos y es necesaria una inversión inicial importante para equipar un laboratorio o centro de cría.

Construcción

Una planificación cuidadosa es crucial en la elección de materiales (vidrio, concreto, plástico o fibra) para la construcción de tanques, cubiertas de tanques (para evitar la pérdida de peces y contaminación) y conexiones. Los materiales del tanque es recomendable que sean razonablemente inertes al agua. En laboratorios se utilizan estanques de plástico que pueden retirarse y ser autoclavados una vez finalizada la experiencia. Los materiales de construcción no tienen que contener cobre, níquel, cadmio o estaño. Los tubos de cloru-

ro de polivinilo se usan comúnmente, pero una vez instalado, el sistema debe ser adecuadamente enjuagado para eliminar la acetona, metiletilcetonas y tetrahidrofuranos residuales que se liberan después del encolado.

Calidad del agua

La filtración biológica, mecánica, química (adsorción) y la desinfección son los cuatro procesos principales a implementar para mantener sistemas de agua cerrados. El cloro debe eliminarse por filtrado o agitación del agua y no tiene que superar 0,003 mg / L. La filtración biológica implica a bacterias heterotróficas y autotróficas (*Nitrobacter* y *Nitrosomonas*) que convierten los compuestos orgánicos nitrogenados (excretas de peces, que consisten principalmente en amoníaco) en nitritos y luego en nitratos que son menos tóxicos. La filtración química que incluye carbón activado granular y resina granulada como intercambiadores de iones se utiliza para reducir el carbono orgánico, amoníaco, nitratos y fosfatos. Los métodos de desinfección por ozonización (O₃) y el tratamiento con luz ultravioleta (UV) se han utilizado para oxidar la materia orgánica y matar las bacterias en los sistemas de flujo y recirculación de agua.

Temperatura

El metabolismo, la salud, los requerimientos de nutrientes, el rendimiento, la reproducción y, en casos extremos, la supervivencia de los peces depende de la temperatura del agua. El equilibrio gradual de la temperatura del agua es crucial en la transferencia, transporte, cría y aclimatación de los peces, así como cuando se ajusta la temperatura del agua.

Iluminación

Tanto el fotoperíodo (horas de luz/oscuridad) como la intensidad de la luz son importantes y los requisitos varían entre las especies. Aunque la mayoría de las especies se desarrollan bien con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, 8-10 horas de luz son generalmente adecuadas para la mayoría de los peces, mientras que 12-14 horas son más apropiadas para las especies de peces tropicales. El pasaje de luz a oscuridad y viceversa en forma gradual puede ser configurado con un temporizador que enciende y apaga la luz durante 30 minutos antes y después de las luces del tanque principal. En relación a la calidad de la luz, la iluminación fluorescente se utiliza comúnmente en acuarios. Generalmente, se puede usar una intensidad de 10-12.000 lux de iluminación de espectro completo sobre la superficie del agua y una longitud de onda de entre 475 y 650 nm a la intensidad adecuada proporcionará una iluminación de buena calidad.

Dieta

Las dietas deben estar formuladas teniendo en cuenta los requisitos de energía y la inclusión de todos los nutrientes esenciales. La preparación tiene que realizarse apropiadamente para satisfacer las necesidades específicas de cada investigación y cada especie,

para asegurar la supervivencia de los animales en el medio acuático y minimizar la contaminación del agua.

pH

Son deseables niveles de pH entre 6,5 y 9,0. El pH tiene múltiples efectos sobre los niveles de gases disueltos y la disolución de metales en el agua, así como sobre la absorción de oxígeno por los peces. También afecta a ácidos orgánicos y fosfatos y la proporción de amoníaco no ionizado y ionizado. Los peces varían en su tolerancia al pH en diferentes etapas de su vida. Se requieren niveles de 6,5 o más para la cría y reproducción normales. También hay variación de las diferentes especies en el requisito de pH. Hay que considerar que los niveles de amoníaco, CO₂ y ácidos orgánicos son importantes para el mantenimiento adecuado del pH.

Salinidad, Alcalinidad y Dureza

La cantidad total de materiales sólidos disueltos en el agua es importante. Los peces necesitan elementos específicos para llevar a cabo procesos bioquímicos vitales y dependen de su medio de existencia para el mismo.

La cantidad de sales disueltas en el agua afecta la densidad de la misma y los requerimientos de temperatura de algunas especies. Al transferir peces de un hábitat a otro, cualquier cambio en la salinidad debe ser gradual.

La alcalinidad del agua es una medida de la capacidad de neutralización del ácido. Los bicarbonatos, carbonatos, boratos, fosfatos y otros aniones contribuyen a la alcalinidad que se expresa en miliequivalentes por litro (mEq / L). La alcalinidad adecuada (0,2-10 mEq / l, agua de mar 2,5 mEq / L) garantiza el almacenamiento en buffer de los metales ácidos y el correcto funcionamiento de los biofiltros.

La dureza es la medida del contenido mineral (principalmente calcio, magnesio y otros cationes divalentes). El agua puede ser muy dura a muy blanda dependiendo de los niveles de los minerales disueltos (Moe, 1992). Una dureza apropiada del agua puede disminuir el estrés, la toxicidad de los metales disueltos y el amoníaco.

Para mantener los peces sanos, el oxígeno disuelto (OD) debe estar cerca de la saturación a cualquier temperatura y salinidad. El oxígeno se difunde en el agua por varios medios de aireación: agitación, oxígeno líquido, difusores de aire (usando compresores de aire o aireadores), tubos en U, piedras porosas y tubos elevadores de burbujas de aire. Una disminución de OD representa un signo de estrés en los peces. La cantidad de oxígeno que un pez requiere depende de la etapa de la vida en la que se encuentre, de la especie, tamaño, así como de la temperatura del agua. Un caudal de 0,7 L de agua por minuto asegura la saturación. Se ha establecido el valor de 5 mg / L como concentración mínima de OD para una salud óptima de los peces.

El nitrógeno está presente en el agua como gas, nitritos, nitratos y amoníaco. El amoníaco es el nitrógeno inorgánico más tóxico producido por los peces y por las bacterias heterotróficas de los filtros biológicos. Se considera que 0,02 mg / L de amoníaco no ionizado es seguro. El

nitrito se forma en procesos de nitrificación y desnitrificación y causa meta hemoglobinemia y, en última instancia, hipoxia. El exceso de amoníaco y los niveles de nitrito son los principales responsables del "síndrome del tanque nuevo" en los peces.

Selección de especies

Al elegir los peces para la investigación de laboratorio, la primera consideración debe ser la elección de las especies a utilizar. Dependiendo del tipo de investigación, las especies se dividen en dos tipos principales: marinos y de agua dulce o salobre. Tomar esta decisión determinará gran parte de la estructura de apoyo vital necesaria, así como comenzar a establecer las medidas de cría. La facilidad de mantenimiento es también un componente principal de la elección de especies. Los animales delicados que requieren cuidados especiales varias veces al día y los que sufren mayores tasas de mortalidad pueden no ser tan deseables como los peces más resistentes que requieren menos tiempo por parte del personal del laboratorio. Factores como la dieta, los requisitos de temperatura, la resistencia a las enfermedades y la compatibilidad social todos deben considerarse antes de seleccionar una especie. Los requisitos de espacio, también, tienen que definirse. Algunas especies, ya sea por su tamaño o por su naturaleza activa o agresiva, necesitan ambientes más grandes, que pueden ocupar espacio en el laboratorio y requerir equipos de alojamiento más grandes y costosos.

Obtención de peces

Una vez que se ha seleccionado una especie de pez adecuada, el investigador debe elegir entre adquirir animales criados en cautiverio o capturados en forma silvestre. Los peces criados en cautiverio son suministrados principalmente por viveros y casas de abastecimiento para laboratorios, también algunos acuarios y aficionados son capaces de proveerlos.

Transporte

Después de la adquisición de los animales de su ambiente natural o de un criadero, se debe tener en cuenta la calidad del agua durante el transporte. En general, cuando se transportan los peces, el enfriamiento del agua tiende a disminuir la tasa metabólica del animal y, por tanto, disminuye la cantidad de amoníaco excretado en el agua. Además, las temperaturas más bajas reducen la necesidad de oxígeno. Los especímenes no deben alimentarse durante 2-3 días previos al transporte, por lo que disminuye la actividad del tracto digestivo y se evita la contaminación del agua de transporte ya que las excretas de los animales disminuyen el pH y afec-

tan la salud de los mismos. Dependiendo de la especie y la duración del tiempo en tránsito, este período de ayuno por lo general es de 1 y 5 días, siendo dos días lo habitual. Deberá utilizarse el número adecuado de cajas de poliestireno y bolsas de polietileno, según el tamaño, la compatibilidad de los peces y la duración en tiempo de su traslado. Con todas las especies, la mejor manera de enviar peces es en una bolsa de plástico llena de agua y oxígeno y envasada en un recipiente aislado de espuma de poliestireno (telgopor) utilizado como caja de transporte, se deben usar bolsas de fondo cuadrado ya que los peces pueden quedar atrapados en las costuras de las bolsas convencionales disponibles en el mercado. Es necesario llenar la bolsa de transporte hasta la mitad con el agua original de residencia permanente de los peces e inflar el resto de la bolsa con oxígeno o aire comprimido para luego amarrarla con una banda de goma para que no se escape el gas o el agua. Cuando las bolsas estén preparadas, pueden envasarse de forma plana en la caja de transporte de peces y colocarlas a su vez dentro de una caja de cartón más grande que luego debe sellarse. En la caja de transporte se recomienda colocar un bloque de hielo mientras se envían especies de agua fría. Un buen trabajo de embalaje conservador debe lograr mantener a los peces de 12 a 24 horas. Dichos contenedores pueden enviarse por transporte aéreo y deben estar debidamente etiquetados. Las cajas de transporte de uso múltiple, muy utilizadas en la actualidad, son buenas para los transportes que tardan de 48 a 72 horas. Si es posible, es aconsejable limitar el tiempo del viaje a menos de 24 horas. Ocasionalmente los peces pueden tranquilizarse ligeramente con un anestésico como MS-222 previo a su traslado.

Producción

Los protocolos de producción de peces varían significativamente entre las especies. Las especies pequeñas extensamente criadas en el laboratorio incluyen el medaka japonés, el pez guppy, y el pez cebra. Los métodos para producir peces transgénicos para investigaciones continúan desarrollándose. Las directrices para la cría de peces en estanques se pueden obtener a partir de los procedimientos actuales de acuicultura. Cuando se desean mantener estanques de investigación, hay que considerar varios factores incluyendo los requerimientos de especies, disponibilidad de sustrato, fuente u origen del suministro de agua (arroyos de agua dulce, agua de pozo, salobre o agua salada) y drenaje. La descarga, especialmente para protocolos de investigación, debe estar de acuerdo con las regulaciones estatales y locales.

Manejo y sujeción de peces

En la manipulación de peces hay que tener en cuenta que son capaces de experimentar dolor, angustia, estrés y baja adaptación a los cambios bruscos de temperatura por el hecho de ser ectotermos acuáticos. Las branquias son estructuras muy delicadas que colapsan cuando

los animales se retiran del agua impidiendo su función respiratoria además poseen escamas cubiertas por una piel formada por células vivas protegidas por una capa mucosa conformando un sistema de protección externo que es muy frágil por lo cual, durante el manejo de los animales, puede dañarse permitiendo el ingreso de patógenos. Por lo tanto, el personal a cargo del cuidado de los animales debe estar debidamente entrenado para satisfacer los requerimientos de las especies que se producen en el laboratorio. También es importante la implementación de barreras de bioseguridad a fin de mantener las condiciones sanitarias de los animales y evitar el contagio de enfermedades zoonóticas. Los peces pueden capturarse con una red de malla fina y suave para evitar el deterioro de su capa externa. De ser necesario sujetar el pez para realizar inoculaciones, se debe hacer con guantes y en el menor tiempo posible. En peces de mayor tamaño y una vez capturados con una red, pueden sujetarse tomándolos con la mano en forma firme del pedúnculo caudal.

Usos en investigación

Los peces son un modelo animal ideal para realizar investigaciones en el campo de la biomedicina debido a su pequeño tamaño, la alta tasa reproductiva, un sistema nervioso central desarrollado y el parentesco con vertebrados endotérmicos. El criterio de selección de peces que se utilizan en investigación se basa en la disponibilidad, la supervivencia en acuarios y la información disponible. Una gran variedad de especies se utiliza en estudios de regulación de la temperatura y electrolitos, embriología, endocrinología, inmunología, fisiología, enfermedades bacterianas, comportamiento, genética y toxicología en la polución del agua.

Además de las investigaciones en laboratorio es posible realizar experiencias sobre los peces en su ambiente natural, donde los mismos también están sometidos a tensiones ambientales (causadas por el hombre y por agentes naturales) que pueden perjudicar su salud y bienestar. Recientemente, como resultado de una mayor preocupación por el uso humano de los vertebrados superiores en la investigación, los peces han sido evaluados como un reemplazo en estudios toxicológicos, farmacológicos y genéticos en vez de emplear ratones, ratas u otras especies de mamíferos. Todo esto produjo un incremento en el uso del pez en las investigaciones y amplió la base de los conocimientos sobre el cuidado y uso de estas especies en el laboratorio. Actualmente, la Ley de Bienestar Animal no incluye ciertos animales como los vertebrados de sangre fría. Sin embargo, todas las instituciones financiadas por entidades de salud pública deben seguir la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, que abarca todas las especies de vertebrados incluidas las especies de sangre fría, entre estas a los peces, considerando una manera profesional y humanamente apropiada para el manejo y uso de la especie en cuestión (Canada Council on Animal Care, 2005; Håstein y col., 2005; Spence y col., 2008).

Especies marinas y de agua dulce que se utilizan en experimentación

Algunas especies de peces que se utilizan con frecuencia en investigaciones son la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (que oscila entre 25 y 30 cm de longitud) y otros salmónidos, como el salmón coho (*O. kisutch*), el salmón rojo (*O. nerka*) Salmón atlántico (*Salmo salar*) y trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*) (menos de 25 cm de largo). Las pruebas de toxicidad se realizan frecuentemente con peces pequeños (*Pimphale promelas*) (hasta 10 cm), carpa blanca (*Cyprinodon variegatus*) (8 cm), platijas (*Menidia beryllina* y *M. menidia*) (hasta 14 cm) y el medaka japonés (*Oryzias latipes*) (hasta 4 cm). Otras especies frecuentemente estudiadas son el siluro de canal (*Ictalurus punctatus*) (hasta 1,2 m), las cabezas moteadas (*Ictalurus nebulosus*) (hasta 50 cm), el pez luna (*Lepomis macrochirus*) (aproximadamente 20 cm), la tilapia (*Oreochromis mossambicus*) (hasta 40 cm), Amazon molly (*Poecilia formosa*) (3-5 cm) y anguila americana (*Anguilla rostrata*) (hasta 1,2 m). También se utilizan especies ornamentales como el pez dorado (*Carassius auratus*) (hasta 30 cm) y koi (*Cyprinus carpio*) (hasta 60 cm).

El pez cebra (*Danio rerio*) es una de las especies más utilizada como animal de experimentación. Este modelo animal tiene menos de 5 cm de largo, se está utilizando actualmente en estudios moleculares y genéticos, en biología del desarrollo, oncología, toxicología, reproducción, genética, neurobiología, ciencias ambientales, en los estudios sobre células madre en la medicina regenerativa y en trabajos sobre la teoría de la evolución.

El pez cebra se llama así por las líneas laterales que adornan su cuerpo y se ha convertido en uno de los animales de laboratorio preferidos por los investigadores. Genéticamente, este pez tropical de agua dulce, posee el 80% del genoma idéntico a los humanos e incluye unos 17.000 genes (el humano tiene 20.000) condición que permite que los resultados que se obtengan en estos animales sean potencialmente extrapolables al ser humano. Posee una filogenia más cercana a la especie humana que la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*) o el gusano nematode (*Caenorhabditis elegans*) y es más fácil de manipular, mantener y criar que la rata (*Ratus ratus* y *R. norvegicus*) o el ratón (*Mus musculus*), siendo estas las especies más utilizadas en experimentación animal. El pez cebra es un organismo modelo, práctico y de elección para estudios dedicados al desarrollo de vertebrados y función génica. Entre sus ventajas posee un rápido desarrollo, externo y es transparente desde el estado de huevo a la larva en 3 días; características que facilitan la manipulación experimental en trasplante celular y observación con diferentes técnicas de microscopía. Sus órganos se forman en sólo 24 horas, gracias a lo cual se pueden realizar diferentes experimentos en una misma generación de animales, investigar la evolución de patologías e identificar las causas de enfermedades. Otra de las ventajas es su capacidad reproductiva ya que la hembra produce hasta 200 huevos lo que permite contar con un número importante de ejemplares para los ensayos en poco tiempo. A pesar de la distancia evolutiva entre esta especie y el humano, el desarrollo de los órganos es similar, como ocurre a nivel del sistema nervioso, páncreas, timo o vasos sanguíneos. Los órganos del pez cebra llevan a cabo las mismas funciones básicas que los órganos humanos, y están sujetos a desórdenes y enfermedades similares.

El pez cebra tiene la capacidad de regeneración en varios órganos como aletas, piel, corazón, cerebro y pueden regenerar fotorreceptores y neuronas de la retina tras una lesión. Este desarrollo en investigación está permitiendo a la comunidad científica entender los mecanismos de cicatrización y regeneración en otros vertebrados. Actualmente se ha descubierto que esta especie posee otra característica: es capaz de regenerar lesiones cerebrales, condición que en otros vertebrados como por ejemplo el humano no sucede. En estudios realizados recientemente se han identificado las células responsables de esta capacidad regenerativa que son un tipo de células madre que pertenecen a lo que se conoce como glía radial. Al detectar el daño, estas células, se dividen, viajan hasta la zona de la lesión y allí se transforman en neuronas. En tres meses, las nuevas neuronas estarán perfectamente conectadas con las demás y no se encuentra ningún rastro de la lesión original. En ensayos futuros, será crucial entender este proceso para conseguir algo similar en el cerebro humano, en el que estas células también están presentes, pero no tienen esa capacidad regeneradora. Si los científicos pueden deducir cómo el cerebro del pez cebra regenera estos tejidos después de sufrir en ellos un daño, debería ser posible obtener los conocimientos necesarios para lograr algo similar en el cerebro humano. También se lo utiliza para estudios sobre nuevas terapias para la enfermedad de Alzheimer, derivadas de esa capacidad regeneradora (Goldsmith y Solari, 2003; Kizil y col., 2012; Spence y col., 2008; Vargesson, 2007; Utne y Smith, 2020).

Identificación en peces

La identificación en estos animales puede hacerse en forma colectiva a través de tarjetas en las que conste la información concerniente al estanque que ocupan y también en forma individual mediante marcas naturales que posean los peces o caravanas en las aletas o cola.

Vías de inoculación y extracción de sangre

Se recomienda colocar una banda de material suave sobre la cabeza para reducir el estrés durante la manipulación de los peces fuera del agua. Los principales métodos de inoculación en los peces son: inmersión en una solución o producto, inyección intraperitoneal (requiere que el animal tenga más de 15 g de peso), inyección intramuscular (principalmente para vacunas de ADN) y administración oral (Bowden y col., 2003a; Klesius y col., 2004). Otros métodos que se han investigado son: el baño, en el cual los peces se exponen al producto por inmersión en el mismo sitio de cultivo, la infiltración anal y el método de spray (Bowden y col., 2003a).

Inoculación por inmersión

Es un método ideal para tratar gran número de peces pequeños (Bowden y col., 2003a; Klesius y col., 2004; Evans y col., 2004). En el tratamiento por inmersión los peces se sumergen en una solución de producto concentrado, este método es más usado que el oral y normalmen-

te proporciona mejores resultados, posiblemente por la mejor absorción del fármaco a través de la piel y/o las branquias evitándose la degradación del mismo en el estómago y además porque algunos antígenos bacterianos utilizados en vacunas ingresan a través de la mucosa gastrointestinal (Bowden y col., 2003a; Klesius, 2004).

Administración oral

La vía oral es el método ideal en acuicultura por la facilidad del procedimiento, por los relativos costos bajos y porque no causa ningún tipo de estrés a los peces, sumado a la posibilidad de tratar grandes poblaciones de peces pequeños en corto tiempo (Bowden y col., 2003^a). Otra ventaja adicional, es la estimulación de inmunidad en las mucosas. Sus principales inconvenientes son la dificultad para determinar la dosis consumida por cada pez, y la necesidad de proteger algunos componentes de la dosis para evitar que se destruyan en el agua o en el estómago de estos animales (Bowden y col., 2003a).

Vía intraperitoneal

Se realiza inoculando en la región posterior abdominal del cuerpo y por debajo de la línea media. Es una vía muy utilizada y la más efectiva para inducir una respuesta inmune, asegura una dosis idéntica en todos los individuos y permite el agregado de adyuvantes que estimulan protección por más tiempo. Sin embargo, los costos y las dificultades de implementación, el estrés excesivo que provoca en los peces, sumado a la poca viabilidad en peces pequeños, y a la estimulación deficiente de inmunidad de superficies, hacen que la inyección de productos a través de esta vía se limite a ciertas especies de peces (Bowden y col, 2003^a).

Vía intramuscular

La vía intramuscular se realiza sobre el lateral superior por encima de la línea media y es poco utilizada a excepción de algunos trabajos experimentales con bacterias en los que se evalúan vacunas experimentales basadas en tecnología de DNA. La investigación sobre vacunas recombinantes se ha enfocado en la estimulación de la protección contra agentes virales como el virus de la pancreatitis necrótica infecciosa (Klesius y col., 2000).

Extracción de sangre

En el pez vivo se obtiene previa anestesia del animal. El anestésico más utilizado es el MS222 (tricain metanosulfonato), que se administra disuelto en el agua en proporción de 1:20.000. Cuando el animal empieza a perder los reflejos, se le saca del agua y se le sitúa en posición lateral. La sangre puede obtenerse de diversos lugares:

Punción directa del corazón

Muy utilizada en sangrado a blanco (Klesius y col., 2000).

Punción de la vena craneal

Es necesario adquirir una buena práctica para poder realizarla y se utiliza para pequeños volúmenes.

Punción de la vena caudal

Es la más utilizada y se encuentra inmediatamente por encima del riñón, adosada a la columna vertebral, puede accederse a la misma desde los flancos del pez o desde la parte inferior por delante del pedúnculo caudal.

Se inserta la aguja inmediatamente por debajo de la línea media del pez, en el tercio posterior del cuerpo y se extrae la sangre. Esta operación ha de ser lo más rápida posible, con el objeto de devolver el pez al agua en un espacio corto de tiempo. Se debe recordar que los eritrocitos del pez, a diferencia de los eritrocitos de mamíferos, presentan núcleo.

Referencias

- Bowden T, Bricknell I, Ellis A. (2003a). Fish Vaccination, an overview. Industry report IntraFish.5-20.
- Canadian Council on Animal Care (2005). Guidelines on the care and use of fish in research, teaching and testing. Ottawa, Ontario. Also available at: www.ccac.ca (7) (PDF) *The welfare of fish*. Available from: https://www.researchgate.net/publication/6259435_The_welfare_of_fish
- Goldsmith P. & Solari, R. (2003). The role of zebrafish in drug discovery Drug Discovery World: Spring 2003.
- Håstein T, Scarfe A, Lund V. (2005). Science-based 1 assessment of welfare: aquatic animals. Rev Sci Tech Off Int Epizoot 24:529–547
- Huntingford F, Adams C, Braithwaite V, Kadri S, Pottinger T, Sandøe P, Turnbull J. (2006). Current issues in fish welfare. J Fish Biol 68:332– 372 (7) (PDF) *The welfare of fish*. Available from: https://www.researchgate.net/publication/6259435_The_welfare_of_fish
- Kizil C, Kaslin J, Kroehne V, Brand M. (2012). Adult neurogenesis and brain regeneration in zebrafish. Dev Neurobiol. Mar;72(3):429-61.DOI:10.1002/dneu.20918.
- Klesius P, Evans J, Shoemaker C. (2004). Warmwater fish vaccinology in catfish production. Anim Health Res Rev. 5:305-311.
- Spence R., Gerlach G, Lawrence C. & Smith C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio* Biological Reviews 83 (1), p13-34.
- Utne A, Smith P. 2020. Fish as Laboratory Animals. The Welfare of Fish DOI: 10.1007/978-3-030-41675-1_16
- Vargesson N. (2007). Zebrafish in Manual of Animal Technology (ed. S. Barnett) Blackwell Publishing Ltd: Oxford, UK.

CAPÍTULO 20

Transporte de los animales de experimentación

Miguel Ángel Ayala

Está claro que la comunidad científica necesita de directrices sobre el transporte de animales de laboratorio para garantizar así las buenas prácticas y el cumplimiento absoluto con la legislación nacional e internacional sobre la cría de animales, provisión, transporte y utilización.

Muchos aspectos del proceso de transporte animal tienen un impacto directo sobre el bienestar. Entre ellos se incluyen la planificación del trayecto o el viaje, el diseño del contenedor, el diseño del vehículo, la formación y actitud del chofer y todos los involucrados en el transporte y duración del viaje, la provisión de agua y alimento. El refinamiento y la evaluación crítica de estos aspectos organizativos del transporte son esenciales para salvaguardar el bienestar del animal durante el viaje. (Classen 1994, Reilly 1998)

El impacto del transporte sobre el bienestar animal

El transporte es un factor de estrés significativo que puede tener un impacto tanto en bienestar animal como en la validez científica de cualquier estudio futuro que implique a los animales. Esto es válido para todas las especies animales.

La respuesta fisiológica o comportamental al estrés afectan a un determinado número de sistemas y funciones biológicas (Reilly 1998). Si el estrés es prolongado o extremo hace falta un esfuerzo considerable para mantener un estado de equilibrio y el animal puede ser consciente de este esfuerzo y como consecuencia sufrir. Este esfuerzo se compone de los efectos del miedo, hambre, sed o dolor, dependiendo de las especies y circunstancias bajo las cuales son transportados (SCAHAW 2002-2004)

Por lo tanto, el objetivo principal de todos aquellos involucrados en el transporte animal es disminuir al mínimo cualquier fuente de estrés o de miedo teniendo en cuenta todos los posibles acontecimientos puedan surgir y estresar al animal durante el viaje. Entre ellos tenemos:

- a. Manejo
- b. La separación de sus congéneres, posiblemente en alojamientos individuales
- c. Confinamiento en un contenedor de transporte desconocido.
- d. Operaciones de carga y descarga
- e. Movimientos de vibraciones durante el viaje incluyendo aceleraciones y frenados

- f. Estado físico para mantener el equilibrio (grandes animales)
- g. Paisajes, olores y sonidos no familiares
- h. Privación de alimento o ayuno voluntario de agua y comida.
- i. Interrupción del ciclo lumínico
- j. Nuevos alojamiento y protocolos de cuidados en el lugar de destino
- k. Nuevos grupos sociales o jerarquías
- l. Nuevas personas.

Para evaluar el estrés de los animales existen diferentes parámetros como niveles de cortisol en sangre, corticosterona, y glucosa, tamaño de las glándulas adrenales, consumo de alimento y agua, pérdida de peso, etcétera (Moberg y Mench 2000).

Muchos estudios avalan que el transporte causa cambios significativos en los parámetros utilizados para determinar el estrés y el periodo de tiempo necesario para que vuelvan al valor basal varían, entre las especies. Por lo que luego del viaje el tiempo de aclimatación a su nuevo ambiente va variar de acuerdo a la especie transportada. (Landi 1982)

Por lo tanto, el transporte es un factor muy potente que debería considerarse como un acontecimiento muy importante, incluso aunque se realicen todos los esfuerzos posibles para minimizar el estrés durante el viaje, los animales sometidos al transporte experimentan en algún momento alguno de los factores estresantes mencionados anteriormente (Moberg 2000).

Para minimizar el estrés de los animales que son transportados es importante considerar cuidadosamente su naturaleza y comportamiento como la postura normal durante el viaje, la disposición de agua y alimento, la salud y bienestar de los animales, incluyendo si se encuentran bien físicamente para poder realizar el viaje, el diseño y material de los contenedores, el número de animales por contenedor de acuerdo a la especie, las condiciones ambientales dentro del mismo, la cantidad y calidad de la cama, la forma de administrar alimento y agua de bebida dentro del contenedor, la duración del viaje, si durante el viaje se producen paradas o cambio de vehículo, el tipo de vehículo y la formación del personal que manipula esos contenedores con animales, y la recuperación y adaptación de esos animales luego del viaje (Landi 1982, Águila 1988, Drozdowicz 1990).

Legislación

La importación y exportación de animales debe cumplir siempre con los requerimientos de la legislación vigente sobre el transporte de cada país por el que transiten los animales. Las personas que realicen el trámite deben tener conocimientos para la obtención de permisos y de esta manera no se retrase el transporte de los mismos. El transporte de animales vivos en la República Argentina está regulado por la Resolución 97/1999 de SENASA. De acuerdo a esta Resolución, los medios de transporte de animales, sean estos terrestre, aéreo o fluvial, deben estar habilitados e inscriptos en un registro a tal fin.

Plan de viaje

La naturaleza del plan de viaje variará dependiendo de la especie, distancia y tipo de vehículo, los mismos deberán incluir datos de contacto de personas que puedan intervenir en casos de urgencias o ayudar en las diferentes etapas del viaje. (Laba/Lasa 1993)

Cuando se planifica el viaje se debe tener en cuenta:

Trayecto

Se debe evaluar las distintas rutas para disponer de una ruta de emergencia en caso de que haya un inconveniente con la ruta elegida, en el caso de que sea aéreo que el viaje sea directo, sin escalas. Es importante tener en cuenta el clima, la hora del día en que se despachan los animales y la estación del año. Por ejemplo, si es en verano y hay altas temperaturas se recomiendan que los animales viajen de noche en horas más frescas, de esta manera se evitan las altas temperaturas.

Documentación

Esta dependerá de la especie, de su estado sanitario, de la ruta de viaje, terrestre o aérea en este caso, debe contar con el número de reserva y número de vuelo, destino y datos de la persona que recibirá a los animales, documentación oficial de servicios veterinarios (certificados de SENASA), certificado de salud avalados por el SENASA, en el caso del contenedor que tenga leyenda de vida animal, el lado para arriba, especie animal el número de animales por contenedor, fecha y hora en que se embalaron los animales, autorización por la compañía aérea para poder viajar y pagos del transporte y permisos emitidos para realizar el viaje. Toda la documentación tiene que estar completa antes de despachar los animales para evitar cualquier retraso en el embarque de los mismos.

Garantía de los estándares adecuados

Es muy importante considerar la experiencia, actitud, competencia y funcionamiento de cada transportador. Es especialmente importante el tipo de vehículo que utilice para transportar animales en todas las etapas del viaje. El vehículo debe cumplir con todas las normativas para poder circular y contar con climatizaciones para brindar un bienestar a los animales durante su transporte.

Contenedores y etiquetado

Los contenedores deben estar preparados para el momento en que se van a embalar los animales, deben tener una cama suficiente para que el comportamiento normal de la especie, deben contar con la presencia de suficiente cantidad de alimento y dispositivos que le suplan de agua a los animales durante el viaje. En el caso de perros se puede hacer previamente cli-

matizaciones en las jaulas de transportes. Las cajas de transportes para roedores tendrán aperturas con filtros de aire absolutos para su ventilación y pequeñas ventanitas para ver a los mismos en su interior (SACHAW 2004)

Etiquetado

Cada contenedor debe estar perfectamente identificado con los siguientes rótulos:

1. Animales vivos
2. Este lado hacia arriba (incluyendo flechas orientativas)
3. Instrucciones de manejo de la caja
4. Tipo, especie y número de animales por contenedor
5. Nombre del remitente con teléfono donde se lo pueda ubicar.
6. Nombre del destinatario, dirección y un teléfono de contacto

Revisión final

Se debe estar en contacto con el destinatario para asegurarse que va a estar esperando a los animales. Si es posible informar a la hora aproximadamente en que van a llegar los animales a destino, se le indica cuando salieron los animales de lugar de origen y en caso de un retraso informarle al destinatario lo antes posible.

Contingencias

Puede pasar que se produzca un retraso en el envío de los animales, por lo que los mismos deberán ser colocados en cajas, jaulas, etc., para poder alimentarlos y darles agua de bebida y en casos de animales mayores puedan hacer sus necesidades y ejercicio.

Cambio de ruta, avería del vehículo en este caso los animales no pueden quedarse solo ni estar expuesto al calor o frío por lo que el chofer debe comunicarse con la empresa para que manden rápidamente otro vehículo e informar al remitente y destinatario del inconveniente.

Defunciones durante el viaje cualquier muerte que se produce durante el viaje se deberá informar al destinatario y buscar la causa del deceso.

Llegada

Una vez que los animales llegaron a destino, el destinatario tendrá alojamientos adecuados a la especie, administrarles agua de bebida, alimento y la cama. Desembalar rápidamente a los animales y hacer una inspección por parte de una persona entrenada para observar el estado de salud con que llegaron los animales.

Aclimatación y aptitud para el viaje

Los animales que se van a transportar deben estar en óptimas condiciones de salud. Esto es importante no solo para mantener su bienestar si no por el estrés durante el viaje puede dar lugar a que las infecciones latentes se vuelvan clínicamente aparentes.

Los animales antes del viaje deben ser inspeccionados por un médico veterinario y no se deben dejar transportar aquellos animales que observan cualquier desviación respecto al comportamiento normal o buen estado de salud.

El confinamiento en un contenedor, las variaciones a las condiciones medioambientales y el movimiento afectan a las diferentes especies distinta manera.

Los animales necesitan un periodo de adaptación cuando se los saca de las instalaciones, especialmente en perro y gatos, en lo que la aclimatación, es una condición necesaria para realizar el viaje. (Laba/Lasa 1993)

El contenedor y su medio ambiente.

Los contenedores para el transporte deben ser adecuados para el viaje y para las especies transportadas. Un contenedor ideal deberá contar con:

- a. mantener los animales cómodos y con el mínimo estrés mientras dure el viaje.
- b. contener suficiente agua y alimento para la duración del viaje.
- c. contener suficiente cantidad de cama para que los animales permanezcan cómodos en una franja térmica apropiada.
- d. permitir una ventilación adecuada
- e. tener las medidas de seguridad para que los animales no puedan escaparse
- f. Estar diseñado de tal manera que los animales no puedan lesionarse.
- g. El diseño también evitara la entrada de agentes microbianos y de esta manera que los animales mantengan su estatus microbiológico.
- h. El material con que está formado el contenedor debe ser resistente y de fácil limpieza y desinfección, resistente al autoclavado.
- i. Debe tener ventanas por donde se pueda observar a los animales en el interior sin abrir el contenedor.

Diseño y materiales

El diseño habitual para transportar pequeños roedores de laboratorio es una caja rectangular con la forma y dimensiones específicas para cada especie.

Estas tienen dispositivos que garantizan la buena ventilación incluso cuando se apilan unas sobre otras ya que la buena ventilación es esencial para el transporte de estos animales sobre todo en ratas que son susceptibles al calor. El diseño de las ventanas debe ser tal que no se puedan ocluir y de esta manera interrumpir la ventilación del contenedor.

Los contenedores microbiológicamente seguros para el transporte de animales definidos microbiológicamente poseen en las aberturas para la ventilación cubiertas para un material similar

a un filtro, este material disminuye la ventilación dentro del contenedor por lo que la densidad animal dentro del mismo es menor.

La cara interior del contenedor será de paredes suaves, resistentes a la humedad y duraderas. Se colocarán mallas metálicas y láminas de plásticos transparentes y como medio de filtración esta recomendado el poliéster. Ratones de diferentes cepas podrán transportarse en el mismo contenedor siempre y cuando este tenga secciones separadas en el interior. En el caso de transportar hámsteres el interior debe estar revestido en su totalidad por mallas metálicas para asegurarse que no puedan roer el interior del contenedor. (Robinson 2003)

Referencias

- Águila N., Pakes S., Lai W. (1988) The effect of transportation stress on splenic natural killer cells activity in C57BL/6J mice. *Laboratory Animals Science* 38, 158-51.
- Claaseen V (1994) Neglected factors in pharmacology and neurosciences research. In: *Techniques in the behavioral and neural Sciences*. Vol 12 (Huston JP, ed) Amsterdam. Elsevier Science pp 422-59.
- Drosdowicz CK., Bowman TA., Webb ML., Lang CM. (1990) Effect in house transport on murine plasma corticosterone concentration and blood lymphocyte populations. *American Journal of veterinary research* 51, 1841-6.
- LABA/LASA (1993) Guidelines for the care of laboratory animals in transit. *Laboratory Animals* 34, 99-104.
- Landi Ms (1982) Effects on shipping on the immune function in mice. *American Journal of veterinary research*. 43, 1654-7.
- Morberg G (2000). Biological response to stress: implications for animal welfare. In: *The biology animals stress: Basic principles and implications for animals welfare*. Oxford: CAB International, pp1-21.
- Morberg G. Mench J (eds) (2000). Biological response to stress: implications for animal welfare. In: *The biology animals stress: Basic principles and implications for animals welfare*. Oxford: CAB International.
- SCAHAW (2002) The welfare of animals during transport (details for horses, pigs, sheep and cattle) Health and consumer protection Directorate General, European Commission.
- SCAHAW (2004) The welfare of animals during transport (broilers and hens, turkeys, ducks, geese, pigeons, and quail, ostrich, deer, rabbits, dogs and cats and fish. European food safety authority. European Commission.

CAPÍTULO 21

Analgesia, anestesia y eutanasia en animales de experimentación

María Clara Vercellini y Guido Mariano Príncipi

Introducción

Los procedimientos experimentales y de producción de animales de laboratorio requieren de personal responsable e idóneo en el manejo de las especies utilizadas.

El uso de técnicas anestésicas seguras y efectivas puede tener una gran influencia sobre el bienestar de los animales del laboratorio. La mejora de estas técnicas debería considerarse un aspecto esencial del perfeccionamiento de los métodos experimentales recomendados por Russell y Burch (Flecknell, 1998).

En esta línea resulta esencial el reconocimiento del dolor del animal de experimentación, que en casos de presentarse deberá ser abolido, reducido al mínimo (Flecknell, 1998) incluso optar por el sacrificio de los animales no exista tratamiento adecuado para evitar el sufrimiento.

En el presente capítulo, revisaremos los principales métodos de anestesia, analgesia y eutanasia en animales de experimentación, Estos métodos son objeto de estudio y evaluación constante, y en ese sentido van evolucionando a través de los años y presentan alternativas para adecuarse a las particularidades cada especie y del protocolo experimental.

Reconocimiento del dolor

El dolor es definido como una experiencia sensorial y emocional no placentera asociada con el daño potencial tisular (Kohn, 2007)

Esto se puede observar claramente en cualquier especie de vertebrados, incluso en invertebrados como cefalópodos, ya que poseen a un sistema nervioso muy desarrollado (Lewbart, 2010)

Se diferencia al dolor de la *nocicepción* que es la capacidad para responder a estímulos sensoriales aversivos (Botana, 2002) presente en numerosas especies invertebradas como esponjas, anélidos, gasterópodos, crustáceos, etc. (Lewbart, 2010).

Para muchos investigadores resulta difícil interpretar el dolor en los animales ya que estos pueden no manifestarlo o expresarlo del modo esperado. Por ejemplo, muchas especies de laboratorio demuestran inmovilidad frente a estímulos dolorosos generando la falsa idea de que, por estar quietos, no sufren. Los roedores vocalizan a escalas ultrasónicas, y solamente emitirán un sonido audible para el oído humano frente a un dolor o estrés intenso (Zuñiga, 2008).

Generalmente en animales vertebrados, los signos clínicos considerados útiles para valorar el dolor incluyen: cambios en la actividad, aspecto, temperamento que puede alternar entre la agresividad y la apatía. Alteraciones en la ingesta de alimentos o de bebida (normalmente disminuye), cambios fisiológicos como aumento de frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, temperatura y presión arterial. Es común observar vocalización, rascado y lamido de la zona dolorosa (perros y gatos).

También pueden determinarse alteraciones en los parámetros bioquímicos (liberación de catecolaminas, cortisol, sustancia P y prostaglandinas en sangre).

Otras características pueden ser, la inmovilidad o posturas anormales, como la postura xifóptica; presencia de pelo hirsuto, secreción de porfirinas alrededor de los ojos (en el caso de las ratas), y cambio en las *fascies*, son signos típicos de dolor en roedores (Zuñiga, 2008).

A diferencia de lo que ocurre con los vertebrados, el reconocimiento del dolor en invertebrados se vuelve más confuso y se presta al debate. Por un lado, un desarrollo limitado de sus sistemas nerviosos plantea la cuestión de si los invertebrados sienten dolor o experimentan incomodidad. Sin embargo, es sabido que pueden responder a estímulos nocivos. En ese caso, será preciso otorgarles el beneficio de la duda y un tratamiento humanitario hasta se demuestre lo contrario (Lewbart, 2010)

De cualquier forma, conocer la biología y el comportamiento de la especie tratada es fundamental para aplicar un correcto manejo del dolor.

Criterios de selección de agentes anestésicos y analgésicos

Los factores a considerar a la hora de seleccionar las drogas dependen del modelo animal y tipo de paciente. Esto significa conocer la biología de la especie con la que estamos trabajando y si se trata de un paciente geriátrico, pediátrico o bien, con una patología de base. Otros criterios son el tipo de fármaco y sus interacciones, así como la vía de administración, la experiencia del personal veterinario, los recursos y equipos disponibles, la seguridad, el costo y la disponibilidad de la/s droga/s (Zuñiga, 2008).

Es necesario tener en cuenta las variaciones individuales o entre cepas (en el caso de ratas y ratones) o razas en otras especies, más allá de la información sobre dosis o concentraciones sugeridas en la bibliografía por lo que se recomienda hacer uso de grupos pilotos antes de tratar a toda la colonia o grupo.

Hay que tener en cuenta que no se puede realizar extrapolaciones de dosis o concentraciones de fármacos entre diferentes especies. Por ejemplo, los animales de pequeño tamaño como los roedores, poseen un metabolismo más alto que los animales de mayor tamaño, por lo que las dosis a utilizar deben ser muy superiores. Sin embargo, al poseer un peso inferior siempre será necesario preparar diluciones ya que las presentaciones comerciales se ajustan en mg/Kg.

Por esta razón, el veterinario debe estar familiarizado con la biología del animal y actualizarse con la bibliografía específica. En casos de especies en las no exista información disponible o de difícil acceso, realizar interconsultas a especialistas del tema puede resultar una herramienta sumamente útil.

Analgesia

Se define como la ausencia de dolor (Botana, 2002). Reúne los procedimientos encaminados a suprimir la sensación dolorosa. Se aplica a procedimientos quirúrgicos, postquirúrgicos o terapias no invasivas que puedan resultar dolorosas.

La analgesia también está indicada como premedicación anestésica, durante el acto quirúrgico y posterior. Para el manejo de dolor posquirúrgico poco doloroso se recomienda su aplicación durante unas 12hs. En procedimientos más invasivos se recomienda aplicar durante 48-72hs o más, posteriores a la intervención. En estos casos, se debe realizar previa a la recuperación del paciente, antes que los animales experimenten dolor (unos 15-30 minutos antes de que se recupere de la anestesia) esto se conoce como analgesia preventiva. De lo contrario, se produce una hipersensibilización, la cual repercute en el ajuste de la dosis.

Los criterios para selección de la droga analgésica y sus combinaciones denominada analgesia multimodal para lograr una anestesia equilibrada (Botana, 2002) estarán relacionados con la duración del efecto, el tipo de injuria tisular, la especie, edad, estado del paciente, los cuidados postquirúrgicos, entrenamiento del personal y costo de la droga. Por ejemplo, en invertebrados se desconocen drogas analgésicas, mientras que en perros y gatos el uso de ANEs debe estar controlado.

Vías de inoculación

Normalmente los agentes analgésicos se aplican vía parenteral intravenosa (IV), subcutánea (SC) o intraperitoneal (IP). En pacientes de mayor tamaño se recomienda IV, mientras que en roedores es común la analgesia SC e IP. En su uso posquirúrgico, además es común usar la vía oral a través del agua de bebida, así como la vía tópica o la infiltración sobre la herida. En aves, no se debe administrar anestésicos locales como analgesia por resultar tóxicos

(Meredith, 2013 & Aguilar, 2010). Y en peces, la vía más común es colocando el anestésico en el agua, mediante la técnica de inmersión (Brown, 2000).

Drogas para uso analgésico:

Opioides

Son potentes analgésicos. Actúan sobre centro respiratorio y cardíaco produciendo su depresión (bradicardia e hipotensión) de forma moderada. Poseen actividad antitusígena. Producen estreñimiento ya que disminuyen el peristaltismo. Aumentan o disminuyen la actividad locomotora dependiendo de la especie (en el humano disminuye mientras que, en el equino, aumenta). Alteran la producción de corticoesteroides en ratas (Botana, 2002).

Se clasifican en:

- *agonistas mu*: inhiben el dolor visceral y térmico. Son buenos para el dolor agudo y crónico. Inducen euforia. Ejemplo: morfina, metadona, oximorfona, fentanilo, alfentanilo, sufentanilo, remifentanilo, etc.
- *agonistas Kappa*: para tratamiento del dolor visceral. Inducen disforia. Ejemplo: butorfanol, nalbufina
- *agonistas parciales, agonistas antagonistas mixtos* Menos potentes que los agonistas puros. Ejemplo: pentazocine
- *Antagonistas*: revierten los efectos de los agonistas puros y mixtos. Ejemplo: naloxona
- Sintéticos: tramadol

Antiinflamatorios no esteroides (AINEs)

Son analgésicos de potencia moderada para cubrir el dolor postoperatorio, dolores crónicos moderados, o procesos inflamatorios que causan dolor o malestar. Inhiben la enzima ciclooxigenasa, bloqueando la síntesis de prostaglandinas. Pueden ser tóxicos a nivel renal, tracto gastrointestinal, y hemático. Inducen vómito, diarrea, insuficiencia renal y trastornos de coagulación. Por lo que la dosificación crónica debe ser controlada, especialmente en gatos y perros (ya que presentan dificultad para eliminar estas sustancias). De menor toxicidad, son carprofeno y meloxicam. Otros ejemplos: aspirina, paracetamol, ibuprofeno, fenilbutazona, flunixin, etc. (Zuñiga, 2008)

Agonistas adrenérgicos

Agentes analgésicos, sedantes y relajantes musculares (Botana, 2002). Con efecto emético en gatos y perros (no contrasta el efecto de la acepromacina). Deprime el centro termorregulador, hipotensores, bradicardia, depresión respiratoria (en altas dosis). Se utiliza principalmente para la premedicación anestésica. Ejemplo: xilacina, medetomidina.

Anestesia

Es un estado de insensibilidad reversible y controlada producido por fármacos, caracterizado por ausencia de cualquier tipo de percepción sensitiva y respuesta motora (Flecknell, 1998).

Los objetivos de la anestesia son:

- Facilitar la manipulación del animal. Realizar procedimientos quirúrgicos
- Proporcionar trato humanitario a los animales.
- Reducir factores negativos de la cirugía.
- Realizar investigaciones que no se podrían realizar con animales conscientes

Etapas de la anestesia

Preanestesia

En la práctica, no es común solicitar un prequirúrgico en especies como roedores, lagomorfos, peces e invertebrados (Zuñiga, 2008). Sin embargo, la evaluación del estado general del paciente, acompañado de una buena anamnesis o registro de la colonia, resultarán muy útiles al momento de contemplar la anestesia.

En la preanestesia, se pueden diferenciar dos situaciones: a) preparación del paciente, conocido como prequirúrgico y, b) premedicación (Botana, 2002).

- Preparación del paciente: Son todos los procedimientos que se le realizan al paciente para mejorar sus condiciones al momento de enfrentarse a la cirugía y valorar su riesgo anestésico (Botana, 2002). Estas medidas contemplan la anamnesis, el examen clínico y de laboratorio, restricción de agua y alimento durante 8 a 12hs para caninos y felinos; en rumiantes de unas 24 a 48hs. En aves y neonatos, se recomienda ayuno de pocas horas o ninguno ya que entran rápidamente en hipoglucemia. No es necesario en roedores, conejos y peces de pequeño tamaño. Se puede hacer fluidoterapia en caso que se requiera. A partir de esto, se va a clasificar al paciente I, II, III, IV, V, según el riesgo anestésico.
- Premedicación: dirigida a facilitar manejo y la seguridad de la anestesia (Botana, 2002). Permite reducir la excitación, obtener una anestesia basal con inducción más segura y suave, y reducir la dosis. Así como controlar los reflejos autónomos indeseables (anestesia equilibrada). Algunas de las drogas que se pueden utilizar en esta etapa son:
- Tranquilizantes mayores: neurolépticos. Fenotiacinas y Butirofenonas: Producen tranquilización, no son analgésicos. Producen relajación sin sedación, y son antieméticos. No recomendado su uso en hembras reproductoras o lactantes. Entre los efectos adversos se mencionan hipotensión, estreñimiento, retención urinaria, aumentan la pre-

sión intraocular, hiperglucemia, reducen la temperatura corporal. Ejemplos: Acepromacina, droperidol.

- Tranquilizantes menores: benzodiazepinas (ansiolíticos): No son analgésicos. Son hipnóticos, sedantes, ansiolíticos, antiepilépticos y relajantes musculares. Ejemplos diazepam, midazolam.
- Parasimpáticos: Evitan efectos indeseables autónomos. Reducen la secreción bronquial y salival. Ejercen el control de la vasodilatación, broncoconstricción y arritmias. Ejemplo: atropina y glicopirrolato.
- Todas las drogas utilizadas para la analgesia.

Anestesia

Un protocolo anestésico ideal debe inducir hipnosis o sueño, un grado apropiado de analgesia intra-operatoria (Flecnell, 1998, p.15), relajación muscular, bloqueo de la actividad refleja, no deben afectar funciones orgánicas, debe ser de fácil administración con acción reversible. De bajo costo y seguro (Zuñiga, 2008). De acuerdo a cada caso se optará por el empleo de anestesia fija o anestesia inhalatoria.

La anestesia propiamente dicha consta de tres etapas:

- Inducción: donde se abolen los reflejos defensivos o se reducen significativamente. Permite la intubación endotraqueal.
- Mantenimiento: los agentes anestésicos deprimen inicialmente la corteza cerebral, luego mesencéfalo, bulbo y, médula finalmente. Las etapas de la anestesia van desde un grado I a IV, pasando desde una etapa excitatoria y consciente, que se va profundizando hacia la II con inconsciencia, hasta alcanzar la etapa III quirúrgica deseada. La etapa IV es indeseada, se caracteriza por una depresión profunda con inminente paro cardiorrespiratorio y muerte, si no se realizan los procedimientos de emergencia adecuados.
- Recuperación

Tipos de anestésicos

Anestésicos locales

Se aplican en forma tópica, por infiltración dérmica o SC, por inyección perineural periférica, paravertebral, epidural o subaracnoidea, y endovenosa (Botana, 2002). Ejemplo: lidocaína. Van a lograr la insensibilidad y analgesia de áreas delimitadas de piel y mucosas, relajación muscular esquelética.

Anestésicos depresores del SNC

La anestesia general puede inducirse utilizando una gran variedad de fármacos y técnicas (Flecknell, 1998)

Agentes volátiles

Se administran por inhalación, siendo absorbidos por esta vía, pasando a sangre por la barrera alveolocapilar (Zuñiga, 2008). Antes se utilizaba óxido nitroso, éter y cloroformo, pero al ser irritantes, inflamables cancerígenos no se consideran seguros. En la actualidad, se usan gases halogenados como metoxiflourano, enflourano, halotano, isoflourano, sevoflourano y desflourano. Requieren de un equipamiento complejo y costoso.

El equipamiento consta de;

1. una máquina de anestesia que suministra el flujo de gas
2. un circuito que dirige el flujo de gas al animal.

La máquina cuenta con: fuente de gases (oxígeno, aire, etc); un reductor de presión, un regulador de flujo (se trata de un émbolo en tubo de vidrio graduado en Lts /min en roedores es de 3lts/min) y vaporizador (donde se deposita el anestésico líquido volátil).

Existen diferentes tipos de circuitos: abiertos, cerrados, semicerrados y cerrados. La elección va a depender del peso del paciente, la seguridad del animal y el ahorro del fármaco.

En roedores de laboratorio se utilizan circuitos abiertos o semiabiertos por la dificultad para intubarlos. Se coloca al animal con una mascarilla rodeando el hocico por donde fluyen los gases. La inducción se hará en una cámara de inducción de plástico metacrilato, transparente donde se colocará al roedor entre 1-5 minutos hasta que ocurre el volteo con una concentración de anestésico superior. Luego, se retira de la cámara y se lo coloca sobre camilla con la mascarilla, con la dosis de mantenimiento.

Agentes no volátiles:

La administración de estos agentes es parenteral ya sea IM, SC, oral o rectal. Ejemplos: barbitúricos, ketamina, propofol, etomidato, medetomidato, etc.

- Barbituricos: Son poco analgésicos. Deprimen SNC, corteza cerebral y tálamo. Generan aumento de la frecuencia cardíaca y reducen presión arterial. Producen depresión respiratoria central. Disminuyen la PIC. Producen efecto acumulativo. Se administran vía IV, de acción ultracorta, y son irritantes de mucosas. No se usa en roedores, pero si en gato, perro, rumiantes y cerdo. Se usa para inducción. Ejemplo: tiopental sódico, pentobarbital.
- Propofol: es un anestésico hipnótico de acción ultracorta. Disminuye la presión arterial y la frecuencia cardíaca. Sin efecto acumulativo. Se utiliza principalmente en goteo
- Etomidato y medetomidato: anestésicos hipnóticos de acción ultracorta similares a propofol y tiopental sódico. Se administran IV. Afectan mínimamente sistema cardiorrespiratorio. Se usa en roedores, cerdos y otros.

- Antagonistas NMDA (n-metil-D-aspartato) Arilciclohexaminas o Fenciclidinas Ketamina y tiletamina: son fármacos disociativos. Se usa en cualquier especie de laboratorio, aves, reptiles y hasta animales silvestres. Producen analgesia visceral con estado de anestesia superficial. Se observan ojos abiertos y dilatados, permaneciendo reflejo palpebral, laríngeo, podal, faríngeo (se indica con atropina). Aumenta la frecuencia cardíaca, y la presión arterial. Se combinan con diacepam, xilacina y medetomidina.
- Opioides: Son excelentes analgésicos pero malos hipnóticos y relajantes musculares. Poseen antagonistas. Se utilizan comúnmente en perros (IV) y ratas (IP)
- Otros: Tricaína (MS 222) y benzocaína: se usa en peces. El metosulfonato también se utiliza en otras especies acuáticas invertebradas.

Monitorización

Durante la anestesia se deberán controlar determinados parámetros en el paciente como:

Respuesta refleja:

Se debe comprobar ausencia de respuestas reflejas espontáneas como reflejo de estación, reflejo deglutorio, palpebral, podal, punción/compresión de la cola y oreja que nunca deben presentarse en un plano anestésico quirúrgico.

Oxigenación, circulación y ventilación:

Para control de oxigenación se debe observar que las membranas mucosas estén rosáceas. La circulación se controla mediante la palpación del pulso arterial femoral o aórtico; la palpación y auscultación del latido cardíaco o TLLC. La ventilación se monitorea mediante movimientos torácicos, el balón del circuito anestésico o la auscultación del tórax. Existen también, monitores electrónicos para control de la función cardiorrespiratoria. Se puede utilizar ventilación artificial mecánica. Se debe controlar la presión parcial de CO₂ en vías aéreas con un capnógrafo, o la saturación de O₂ con pulsioxímetro. Estos equipos son caros.

Control de temperatura

Mediante termómetro (difícil en roedores y animales pequeños). Se debe usar almohadilla térmica para evitar la pérdida de calor, sobre todo en animales pequeños.

Medidas de soporte

En roedores no se utilizan otras medidas de soporte como *vía aérea permeable* (ventilación espontánea de oxígeno) y *vía venosa permeable* mediante fluidoterapia (Zuñiga, 2008). Estas medidas sí se utilizan comúnmente en perros, ovinos, cabras y con cierta práctica, en gato y cerdo. En conejos, se pueden aplicar una vía venosa permeable a través de la vena de la oreja. Esta última vía, permite también aplicar fármacos de emergencia como dopamina o dobutamina ante un inminente paro cardíaco.

Período postanestésico

Es el período de recuperación anestésica donde ocurre el paso entre el período de inconsciencia producido por la anestesia, al de consciencia (Zuñiga, 2008). Es ideal que sea gradual, libre de excitación y dolor, hasta retornar su estado fisiológico lo antes posible

Entre los cuidados posoperatorios se debe controlar la frecuencia cardíaca y respiratoria.. La hipotermia es la complicación más frecuente, por lo que debemos procurar un ambiente de recuperación cálido y control periódico por parte del personal hasta que logre superar el período de sueño. En algunas especies se requiere jaula de contención para evitar traumatismos. Finalmente, para mejorar la recuperación se recomienda uso de analgésico postoperatorio. Los fármacos comúnmente utilizados son los mismos que para la premedicación como AINES, opioides y tramadol. En algunos casos, se requerirá aplicación de ATB y fluidoterapia (IV o SC).

Eutanasia

Por definición es el acto del sacrificio humanitario con el mínimo dolor, temor y angustia o stress. Deriva del griego donde “eu” significa bien o buena, y “thanatos” significa muerte.

En experimentación animal, la eutanasia puede indicarse como final de una experiencia, o cuando resulta muy elevado el nivel de dolor, angustia o sufrimiento, superando los niveles adecuados para su bienestar, o la imposibilidad de tratamiento. A su vez, puede utilizarse para la obtención de una muestra de sangre o tejido asociada al protocolo de estudio correspondiente. Asimismo, puede aplicarse con animales que no sean aptos para la cría o animales no utilizados o inadecuados. Es aplicable también en el PUNTO FINAL HUMANITARIO: donde se toman en cuenta criterios que sirven para finalizar un procedimiento más temprano, evitando el dolor, sufrimiento, y que el método empleado no altere los resultados experimentales.

La técnica tiene que ser indolora, que produzca una rápida inconsciencia y muerte, con mínima inmovilización, miedo y stress. En este sentido, también debe ser fiable y reproducible, irreversible, sencilla de realizar y que no produzca daño en los tejidos sobre todo los que son objeto de estudio. Para el operador debe ser estéticamente aceptable, segura y en lo posible económica.

La eutanasia requiere de personal entrenado que en primer lugar debe conocer la biología, fisiología, manejo y sujeción de la o las especies con la que trabaja. También debe reconocer los signos de dolor, temor y angustia, conociendo el comportamiento o conducta normal y anormal, y las respuestas fisiológicas asociadas al temor o angustia. Asimismo, debe entrenarse en los métodos y como realizarlos, el destino de los residuos o cadáveres, y nociones de bioseguridad en el manejo del reactivo biológico.

Es importante contar con el equipamiento adecuado para realizar el procedimiento y que el mismo deba ser periódicamente inspeccionados, asegurando su buen estado y limpieza de sangre, orina y heces de otros animales. (Leary. 2013)

Otro aspecto importante es que el método va estar condicionado por el objetivo de investigación, teniendo en cuenta que algunos métodos pueden alterar los órganos o los parámetros fisiológicos del animal en estudio. Por ejemplo, además de los métodos físicos que en general causan lesión por trauma de tejidos principalmente cerebrales, podemos mencionar que la inyección IP de barbitúricos puede formar artefactos para la histología de los tejidos intestinales, el anestésico inhalatorio isoflurano que puede elevar artificialmente las concentraciones de glucosa en sangre y el método por inhalación de CO₂ que puede elevar las concentraciones de potasio sérico, entre otras que debemos evaluar para decidir el método que mejor se adapte al objetivo del estudio.

La elección del método

Va a depender de una serie de factores:

- De la especie y asociado a su edad y principalmente al tamaño.
- Del estado de salud tomando en cuenta del tipo y grado de afectación orgánica y de los tejidos.
- Del propósito del estudio o destino del cadáver, utilizando los métodos aceptados que no alteren los resultados experimentales o no dañen los tejidos
- Del número de animales a sacrificar

Manejo e inmovilización

Todos los procedimientos de eutanasia aplicados a animales requieren de algún tipo de inmovilización y en este sentido es de vital importancia un control adecuado para minimizar el dolor y la angustia en los animales, y asegurar la bioseguridad del personal a cargo. El trato tiene que ser suave pero seguro. Algunos métodos, sobre todo los físicos, requieren mayor inmovilización. Puede ser necesaria la utilización previa de fármacos tranquilizantes o sedantes, cuando la captura pueda generar mayor dolor, lesiones, ansiedad en el animal, o peligro al operador. Para la eutanasia de animales debemos tener en cuenta que las maniobras de transporte, la manipulación, la ruptura de grupos compatibles son causa de estrés y que es casi imposible eliminar todas estas variables, pero si conocerlas y en la medida de lo posible reducirlas o controlarlas.

Mecanismos básicos de eutanasia

Los agentes pueden causar la muerte por:

- hipoxia cerebral que a su vez puede ser directa o indirecta.
- Depresión cerebral o neuronal para las funciones vitales.

- Interrupción física de la actividad del cerebro y destrucción de neuronas esenciales para la vida

Clasificación de los métodos más utilizados en animales de experimentación

En primer lugar, podemos mencionar que existen los métodos físicos y químicos. Los físicos producen la muerte por trauma cerebral directo y/o corte o ruptura de vasos para producir anoxia. En cambio, los métodos químicos producen hipoxia cerebral o depresión nerviosa severa. Estos se dividen en inyectables e inhalatorios.

También se pueden clasificar en métodos aceptables con animales conscientes y métodos para animales previamente inconscientes. Finalmente existe un listado de métodos inaceptables de eutanasia porque causan sufrimiento al animal o son peligrosos para el operador.

La elección de un método de eutanasia por cada experiencia particular debe contemplar las normativas vigentes al respecto, y deben ser evaluados por un comité de bioética para validar los resultados experimentales.

Métodos Físicos

Estos métodos producen pérdida inmediata de la conciencia por trauma físico en el cerebro. Cuando son bien realizados por personal entrenado producen mínimo dolor y/o angustia y no requieren de productos químicos. En particular requieren métodos de sujeción y/o inmovilización. Algunos producen solo inconciencia y debe confirmarse la muerte por otro método complementario. Estos procedimientos tienen como desventaja que resultan desagradables para la observación y no están recomendados para el sacrificio de muchos animales. En manos inexpertas se puede producir un dolor y angustia elevados. Tienen la ventaja de no requerir de sustancias que pudieran interferir con los objetivos del experimento.

Los métodos físicos aceptados en animales son:

- Disparo
- Dislocación cervical
- Concusión
- Irradiación con microondas
- Decapitación
- Aturdimiento eléctrico

Disparo

Es el método más empleado en mamíferos y reptiles de gran tamaño. Puede ser disparo con bala convencional (bala libre), con los riesgos que este método implica y una variante más segura de bala cautiva, donde un émbolo golpea a gran velocidad y por rebote vuelve produciendo concusión e inconsciencia por noqueo. Este método requiere el posterior corte de un

vaso de grueso calibre para la exanguinación y muerte. Es un método común utilizado en grandes animales en mataderos y frigoríficos.

Dislocación cervical

Es uno de los métodos más utilizados en pequeños roedores, ya que aunque no es agradable por el operador, es un excelente método por ser rápido y con mínimo dolor (este último más asociado a la a sujeción previa que al método en sí). Produce la muerte porque causa graves daños al tallo cerebral y una inconsciencia instantánea. Consiste en sujetar al animal sobre una superficie de agarre que puede ser la reja de la caja de alojamiento, para que no se resbale y tienda a sujetarse. Con una mano se toma la base de la cola y con la otra el cuello en la unión con la cabeza, maniobra a partir de la cual se realiza la tracción de la cola dislocando la cabeza con la consecuente ruptura del tallo cerebral y vasos sanguíneos del cuello. Es sencilla y efectiva, su inconveniente radica en que limita el número de animales por día y por operador, que no es agradable, que no sirve para estudios en los que se requiera intacto el tallo cerebral o toma de sangre. Se limita también, por el tamaño del animal y el desarrollo de la musculatura del cuello asociada. Como opción puede sujetarse la base de cola con una mano, utilizando un objeto romo en la base del cuello, como pinzas o tijeras quirúrgicas o de manejo. Puede ser empleado en ratones y en otros roedores jóvenes; en conejos, perros y gatos recién nacidos y en peces y aves. Los roedores y conejos de mayor tamaño, pero de peso inferior a 1 kg deben estar sedados o aturdidos previamente.

Concusión

Consiste de un golpe certero en el cráneo con un objeto romo diseñado para tal fin. Requiere de entrenamiento especial del operador, resultando una técnica alternativa a la de la bala cautiva en animales de mayor tamaño. Tiene que ser realizado por una persona experta, nunca se empleará el martillo o el hacha como método de aturdimiento. Este método puede asociarse con la dislocación, para asegurar la muerte por exanguinación o lesión irreversible del corazón o del cerebro, inmediatamente después del aturdimiento.

Puede utilizarse en animales pequeños como conejos pequeños, ratas, ratones, cobayas jóvenes, hámsteres, aves, pequeños reptiles, anfibios y peces.

Decapitación

Este método requiere de una guillotina o instrumento cortante especialmente diseñada para cada especie. Debe realizar la operación rápidamente y en un solo intento.

Requiere de un sistema de inmovilización y de controlar constantemente su buen funcionamiento, el filo y la limpieza. Se utiliza para estudios donde se quiere obtener tejidos nerviosos del cráneo intactos y en fresco. Es recomendable la sedación o aturdimiento previo teniendo en cuenta que esta maniobra no implique más sufrimiento al animal. El método consiste en la separación total del cuello y la cabeza. Se usa en roedores y conejos pequeños, peces, anfibios y aves. A pesar de considerarse un método aceptable, es recomendable el uso de otras alternativas.

Irradiación con microondas

Son aparatos especiales que concentran la microondas en un punto. Irradiación con microondas: se emplea en animales de peso menor a 300 g, aplicando una radiación de microondas sobre el cerebro. Es un método empleado por neurobiólogos para fijar los metabolitos cerebrales. Requiere la utilización de un equipamiento específico, y no es posible el uso de equipos domésticos.

- Animales de menos de 300 g
- Empleado en neurobiología

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 o una horquilla específica para tal fin. Hay que asegurar la aplicación correcta de los electrodos, ya que en caso contrario puede provocar sufrimiento en el animal. El paso de la corriente eléctrica por el cerebro produce inconsciencia y sobre el corazón la parada por fibrilación ventricular. Dado que la inconsciencia es temporal, los animales deben sacrificarse con un método confirmatorio. Es común en cerdo y otros animales menores. La descarga aplica una corriente alterna de 70 a 350 voltios entre 4 y 30 segundos dependiendo del tipo de aparato y de la intensidad de la corriente y del tamaño y la especie de destino.

Métodos químicos

Se basan en la administración de agentes anestésicos inyectables y gases inhalatorios que producen inconsciencia, fallo cardiovascular, respiratorio y muerte. Debido a la posibilidad de que se produzcan errores en la dosificación o administración y el animal pueda recuperarse, siempre hay que confirmar la muerte. En roedores y animales pequeños puede estar limitadas la vía y los volúmenes de administración. Los agentes químicos que produzcan la muerte sin inconsciencia previa, no son aceptados (Por ejemplo: agentes paralizantes, cloruro potásico, etc.).

Agentes inyectables

Son principalmente anestésicos o los contienen en su composición. Se administran de forma concentrada para favorecer su efecto de depresión del SNC y la muerte.

Si se emplean otras sustancias tóxicas o paralizantes, éstas deben actuar siempre después de que el anestésico haya producido su efecto evitando el sufrimiento del animal. La vía de elección suele ser la intravenosa para que el mismo sea más rápido y potente. Como alternativa en pequeñas especies donde es limitado el acceso venoso puede emplearse la vía intraperitoneal. Las rutas enterales, intramuscular o subcutánea no son adecuadas porque inducen el efecto anestésico muy lentamente y requieren dosis superiores, y otras vías como la intraarte-

rial, intracardíaca o intrapulmonar se consideran inaceptables porque producen angustia y dolor. Algunos animales agresivos o difícilmente manipulables deben ser sedados previamente para poder manipularlos posteriormente y obtener un acceso venoso.

Los medicamentos anestésicos para las eutanasias son generalmente utilizados al doble o triple del recomendado de dosis anestésica. En todos los casos, la muerte debe ser confirmada por la destrucción del cerebro (Close, 1997).

Barbitúricos

Son los eutanásicos más empleados porque producen la muerte sin sufrimiento siendo además baratos. El fármaco más difundido es el pentobarbital, aunque también están disponibles otros barbitúricos no utilizados como anestésicos. Administrados por vía IV producen la muerte en pocos segundos por depresión del SNC y de los sistemas cardiovascular y respiratorio. También puede administrarse por vía IP, pero el elevado pH de la dilución produce dolor en la inyección y es recomendable diluirlo previamente para reducir o eliminar el malestar del animal. La administración intracardíaca sólo es aceptable cuando el animal está inconsciente.

T-61

Es una formulación de eutanasia específica para animales de experimentación. Corresponde a la presentación comercial de un barbitúrico asociado a un paralizante tipo despolarizante y un anestésico local, tetracaína, para reducir el dolor producido durante la administración IV. El efecto paralizante es simultáneo al anestésico, y el animal no sufre durante la eutanasia.

Agentes inhalatorios

Son todos aquellos agentes que pueden suministrarse en forma gaseosa. Ya sean anestésicos o gases eutanásicos. Los anestésicos inhalatorios son muy seguros por lo que en general requieren de dosis altas para eutanasia. Su uso como eutanásico va primordialmente asociado a un acto anestésico que culmina con el sacrificio del animal. Hay que tener en cuenta su metabolismo y los efectos fisiológicos que pueden causar en el momento de validar los resultados experimentales para los que se emplean.

Los animales pequeños como los roedores se introducen en cámaras o cajas con el gas. En animales mayores se utiliza la intubación endotraqueal o se utilizan cámaras especiales para inhalación del gas. Los agentes seleccionados deben ser tolerados por los animales para que no produzcan estrés ni convulsiones previas a la inconsciencia. No se recomiendan en recién nacidos por su tolerancia a la hipoxia.

Dióxido de carbono

Es uno de los agentes más utilizados para la eutanasia de animales pequeños. En concentraciones superiores al 60% por su efecto anestésico produce inconsciencia y concentraciones

superiores al 70% se emplean para producir la muerte. Tiene como desventaja que puede producir ansiedad y estrés en los animales, motivo por el cual este método es evaluado permanentemente. Para reducir el malestar previo a la muerte se administran flujos rápidos de CO₂ o bien se llena la cámara previamente de este gas con la administración simultánea de oxígeno (33% del flujo de CO₂ + O₂). Como el CO₂ es más pesado que el aire los animales se deben ubicar en la zona inferior de una cámara. Se puede colocar una rejilla o tope en la zona superior, para que los animales no puedan trepar. Las cámaras deben poseer un orificio inferior de ingreso del gas y un orificio de salida, en la parte superior que se cierra una vez que se produjo la inconsciencia y se llega a concentración adecuada. Existen equipos disponibles comercialmente para la eutanasia efectiva.

La técnica puede producir excitación o una inducción a la inconsciencia demasiado larga en especies de tamaño medio, como gato, perro o cerdo, y en peces y otros animales de sangre fría, por lo que puede no recomendarse (Ampan, 2014).

Monóxido de carbono

Es un método que se utilizaba antiguamente para animales pequeños. Es suficiente una concentración del 6% en cámaras selladas. Es un gas inodoro e incoloro. Tiene la desventaja que es peligroso su uso en ausencia de equipos adecuados y espacios ventilados. Este gas se combina de manera irreversible con la hemoglobina e impide que el oxígeno sea transportado, siendo peligroso para el manejo del operador, por lo que no es un método recomendado.

Anestésicos inhalatorios

Producen inicialmente anestesia, y después muerte por sobredosis. Resulta un método humanitario y bien tolerado. Los anestésicos más adecuados son los halogenados como el halotano o el isoflurano. El primero es más barato y tolerado que el segundo, pero ambos actúan rápidamente en la mayoría de las especies, sobre todo en roedores. En el conejo debe existir una inconsciencia previa con una combinación inyectable. Solo no se utiliza porque la inhalación directa puede producir angustia y sufrimiento por hipoxia. El halotano tiene como desventaja su metabolismo hepático, que puede alterar estudios específicos.

Agentes para animales acuáticos

En estas especies se utilizan agentes se diluyen en el agua, como la benzocaína, la triclaína metano sulfonato (MS-222), el etomidato y metomidato, y la quinaldina. Según su concentración en agua producen depresión del Sistema Nervioso Central (SNC) y la muerte.

Métodos aceptables en animales inconscientes

En general se asocian a métodos de confirmación de muerte en animales noqueados o previamente sedados o anestesiados. En todos los casos su uso deberá ser evaluado y justificado por el método seleccionado contemplando el destino de los estudios y la disponibilidad del método y la no existencia de otras maniobras adecuadas. En todas estas técnicas hay que confirmar la muerte del animal.

Exanguinación

Consiste en la lesión de vaso de gran calibre como las arterias aorta, carótidas o femorales o las venas cavas, yugular o femorales; o la punción cardíaca directa en especies menores. Produce una pérdida aguda y masiva de la volemia con el consecuente paro cardíaco. No es un método aceptable en aves y en animales de sangre fría (poiquilotermos) por su elevada tolerancia a la hipoxia.

Inserción de aguja

Hay que realizarla en animales aturcidos o anestesiados, con un operador experimentado. Se emplea en aves, peces, anfibios y reptiles introduciendo una aguja por el foramen magno hasta la base del cerebro, lesionándolo.

Embolia gaseosa

La inyección de un embolo de aire en cantidades suficientes produce el taponamiento de capilares pulmonares e imposibilitan la oxigenación y circulación de la sangre.

Congelación rápida

Es la introducción del animal o su cabeza en nitrógeno líquido. También existen equipos especializados o túneles de congelación. Permite obtener tejidos, como el cerebro, en condiciones óptimas para su estudio, sin que se produzca hipoxia. Suele emplearse en animales pequeños.

Nitrógeno/argón

Sólo se emplea en animales anestesiados y producen la muerte por hipoxia reduciendo o eliminando el oxígeno de la mezcla de gas respirada.

Etanol e hidrato de cloral

La sobredosis de etanol e hidrato de cloral, produce depresión del SNC y paro respiratorio.

Cloruro de potasio

El exceso de ión potasio en la sangre produce fallo cardíaco y muerte. Es un agente muy barato y eficaz a dosis (sobredosis) adecuadas. Hay que confirmar la muerte del animal.

Métodos inaceptables de eutanasia

Son todas técnicas que pueden inducir dolor intenso, muerte lenta, ser estéticamente desagradables, tóxicas para el operador o peligrosas, por lo que son métodos inaceptables y además poco prácticos.

Entre ellas podemos mencionar descompresión/vacío, hipotermia e hipertermia, ahogamiento, rotura de cuello y estrangulación dentro de los métodos físicos. Por otro lado, anestésicos, sedantes, paralizantes musculares o bloqueantes neuromusculares y narcóticos de acción lenta o errática; y agentes químicos como ciclopropano, éter, cloroformo, ácido cianhídrico, tricloroetileno, potencialmente peligrosos (Close, 1996).

Algunas consideraciones sobre especies invertebradas

En la actualidad, cada vez está siendo más frecuente el uso de especies invertebradas en investigación (Lewbart, 2010). Esto abre un campo interesante en la incumbencia del profesional veterinario. Por un lado, basados en el criterio de las 3R, muchos investigadores están intentando reemplazar estudios que involucran vertebrados superiores por invertebrados, justificados en el uso de equipamiento más simple y económico, y además, por ser especies con menor capacidad de sentir dolor. Aunque esto último, está en profundo debate.

La mayoría de las especies invertebradas presentan un desarrollo nervioso más rudimentario que los vertebrados, sin embargo, no significa que no presenten respuestas aversivas a estímulos dolorosos y cambios en el comportamiento como han indicado numerosos estudios en crustáceos, moluscos e insectos como *Apis mellifera* y *Bombyx nori* (Lewbart, 2010)

Se sabe que los cefalópodos poseen un sistema nervioso muy desarrollado con un cerebro recubierto de un cráneo cartilaginoso que responde a estímulos dolorosos como cualquier vertebrado.

Si bien se desconocen terapias analgésicas, es común el uso de anestésicos en estas especies aplicados de forma inhalatoria como isoflurano (en insectos terrestres y artrópodos), o en el agua, para especies acuáticas como metanosulfonato (insectos, crustáceos, etc.) o cloruro magnésico (cefalópodos). Incluso la eutanasia, se debe realizar con previa insensibilización (anestesia) antes de la destrucción física por congelación, decapitación, ebullición, inmersión en etanol o formalina. De hecho, el enfriamiento comúnmente usado para sujeción de insectos y arañas, se considera adecuado para maniobras no dolorosas. En todos los casos, se recomienda minimizar o refinar los procedimientos traumáticos.

La incipiente medicina de invertebrados y su actual crecimiento, evidencia la necesidad de profundizar nuestro conocimiento en el manejo de dolor de especies no tradicionales de laboratorio, donde el enfoque veterinario resulta imprescindible.

Referencias

- Aguilar, R. F., Hernández, S. M., Divers, S. J., & Perpiñán, D. (2010). Atlas de medicina de animales exóticos. Bs As: Interamericana
- Amparan, AA, Djoufack-Momo, SM y Grunden, B. (2014). Exposición del personal de investigación al dióxido de carbono durante los procedimientos de eutanasia. *Revista de la Asociación Estadounidense de Ciencia Animal de Laboratorio*, 53 (4), 376-380.
- Close, B., Banister, K., Baumans, V., Bernoth, EM, Bromage, N., Bunyan, J., Warwick, C. (1996). Recomendaciones para la eutanasia de animales de experimentación: Parte 1. *Animales de laboratorio*, 30 (4), 293-316.
- Close, B., Banister, K., Baumans, V., Bernoth, EM, Bromage, N., Bunyan, J., y Warwick, C. (1997). Recomendaciones para la eutanasia de animales de experimentación: Parte 2. *Animales de laboratorio*, 31 (1), 1-32.
- Botana López, LM, Landoni, MF, y Martín-Jiménez, T. (2002). Farmacología y terapéutica veterinaria. Madrid: McGraw-Hill Interamericana
- Brown, L. (2000). Acuicultura para veterinarios. Producción y clínica de peces. España: Acribia.
- Flecknell, PA (1998). Laboratorio de anestesia animal. Una introducción para investigadores y técnicos. España: Acribia
- Kohn, DF, Martin, TE, Foley, PL, Morris, TH, Swindle, MM, Vogler, GA y Wixson, SK (2007). Directrices para la evaluación y el tratamiento del dolor en roedores y conejos. *Revista de la Asociación Estadounidense de Ciencias de los Animales de Laboratorio*, 46 (2), 97-108.
- Leary S, Underwood W, Lilly E, et al (2013) AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2013 Edition. American Veterinary Medical Association, Schaumburg, Illinois
- Lewbart, G. A. (2010). Medicina de los invertebrados. España: Acribia.
- Meredith, A., Redrobe, S. (2013). Manual de animales exóticos. España: Lexus.
- Zúñiga, J. M., Muriana, J. M. O., Tur, J. A. (2008). Ciencia y tecnología del animal de laboratorio: formación avanzada de postgrado. España: SECAL

CAPÍTULO 22

Modelos animales

Fabrizio Maschi

Modelos animales: consideraciones generales

En la investigación biomédica se emplean diversas categorías como material experimental, pudiendo ser desde voluntarios humanos, animales de experimentación, órganos, tejidos, embriones, células de diverso origen, bacterias, hongos, protozoos y hasta modelos inanimados como diversos programas de computación, productos físicos y químicos. El material experimental debe elegirse de manera simple para que pueda resolver el problema en estudio fácilmente. El investigador debe tener presente no sólo las consideraciones científicas a la hora de la elección, sino también cuestiones éticas y legales.

La mayoría del conocimiento que poseemos sobre fisiología, bioquímica y endocrinología general procede de la experimentación con animales. Y ese conocimiento se extrapola al hombre.

Pero además de fines experimentales o médicos, los animales se emplean para proporcionar productos biológicos como por ejemplo suero de yeguas preñadas para el tratamiento de fertilidad reducida. También se emplean los animales para el estudio de respuestas biológicas, y estos estudios son importantes para conocer los efectos tóxicos de algunas sustancias y para medir eficacia y seguridad de fármacos y vacunas. Los animales funcionan como un dispositivo de medición sensible. Del mismo modo, gracias al empleo de animales se han logrado avances en el estudio de procesos fisiológicos, patofisiológicos y etológicos del animal y su percepción en otras especies. Esto ha permitido esclarecer mecanismos de desarrollo de tumores y disfunciones metabólicas (Montero J.L., 2008),

Modelo animal

Definición

El concepto de modelo animal es fácilmente comprensible si nos basamos en la etimología de las palabras que lo componen: animal proviene de *Anima* (del latín) indicando que los organismos animados son organismos vivos. Y modelo, es un objeto de imitación, un ser vivo o una parte de él que nos recuerda a otro que es imagen de otro.

Si combinamos estas definiciones es posible decir que un modelo animal es un objeto animado de imitación, utilizado para investigar circunstancias fisiológicas o patológicas, que se crea y se utiliza en la investigación de la causa, naturaleza y tratamiento de los fenómenos funcionales y de las enfermedades humanas y animales.

El significado más usual para el término modelo animal hace referencia a modelos humanos, siendo la parte más importante del modelo animal la analogía del comportamiento fisiológico de este animal hacia la especie humana u otras especies.

“Es aquel capaz de reproducir parcial o totalmente una característica determinada que sirva para extrapolar al hombre o a otros animales y se adapte al estudio que se realiza” (Van der Gulden y col., 1993).

Selección del modelo apropiado

La selección de la especie animal, raza y cepa para ser utilizada, así como el método a aplicar, es una de las decisiones más importantes a tomar. No hay normas relativas a la elección de un modelo animal apropiado ni normas para la extrapolación de los resultados de un modelo a otra especie animal o al hombre.

Es muy importante tomar en cuenta como generalizaremos o extrapolaremos los resultados obtenidos en nuestro estudio, por lo tanto, tener en cuenta la homología o similitud evolutiva de las estructuras morfológicas y los procesos fisiológicos, entre las distintas especies animales es fundamental para considerar los buenos modelos análogos.

Aunque existan diferencias lógicas entre las distintas especies y el hombre, aun así se podrán encontrar similitudes, razón por la cual se deben conocer las características anatómicas y funcionales de cada especie para obtener resultados extrapolables.

La selección de una especie no debería estar basada únicamente en la disponibilidad, familiaridad o bajos costos, ya que éstas no tienen por qué ser las que nos proporcionen las características genéticas, fisiológicas o psicológicas necesarias para nuestro proyecto de investigación. Los mamíferos por sus semejanzas obvias en cuanto a su estructura y función son los que más se han empleado, y fundamentalmente ratas y ratones gracias a su pequeño tamaño, vida útil corta, facilidad de manejo y alta tasa reproductiva.

El empleo de estos modelos ha aportado grandes hallazgos en la comprensión y control de la salud y las enfermedades.

Existen ciertos criterios que se pueden aplicar y pueden ayudar a la elección del modelo más apropiado, por ejemplo, los de Svendsen y Hau (1994):

1. ¿El problema es digno de investigar / resolver?
2. Si, ¿puede ser resuelto de alguna forma?
3. Si, ¿puede desarrollarse en un modelo humano?
4. No, ¿existe algún modelo animal apropiado?
5. Si,

- ¿Es apropiada la especie elegida para resolver el problema?
 - ¿Existe algún estudio previo sin éxito, que demuestre que el modelo es inadecuado?
 - ¿Pueden ser controladas las variaciones genéticas/ambientales?
 - ¿Puede ser controlado el estado sanitario del modelo en todo el estudio?
6. La decisión de elección a favor del modelo, ¿se basa sólo en criterios científicos o se ha considerado:
- ¿Capacidad del personal e instalaciones?
 - ¿Restricciones financieras, legales, éticas?
 - ¿Disponibilidad?
 - ¿Otros aspectos logísticos?
7. ¿Son las concentraciones y rutas metabólicas de la sustancia probada comparable en el modelo, frente al hombre? Si
8. ELECCIÓN CORRECTA

Clasificación de los modelos

La mayoría de los modelos animales de laboratorio han sido desarrollados y utilizados para el estudio de la causa, naturaleza y cura de los trastornos humanos. Estos modelos se clasifican en dos grandes categorías, por ser los utilizados: los modelos espontáneos y los modelos inducidos.

Pero también hay modelos que han sido y se siguen utilizando en biología estructural y funcional, pudiendo ser estos modelos exploratorios, cuyo objetivo es entender los mecanismos biológicos y los asociados a una función biológica anormal; pero cuando el objeto es entender las funciones biológicas más o menos complejas se utilizan modelos explicativos. Estos últimos no necesariamente deben ser modelos animales, pueden ser modelos físicos o matemáticos desarrollados para aclarar los mecanismos complejos. Otro tipo de modelos son los modelos predictivos los cuales se emplean con el propósito de descubrir y cuantificar el impacto que tiene la toxicidad de un compuesto o un producto ensayado y si cura o no la enfermedad.

El conocimiento de la anatomía o morfología de las estructuras es otro punto importante a considerar. La similitud de la estructura biológica en el animal con la correspondiente estructura en el hombre es lo que se conoce como fidelidad. Por lo tanto, los modelos con alta fidelidad, es decir, los que tienen una gran semejanza con el humano corren con ventaja a la hora de la elección. Sin embargo, esta última condición sola no nos dice nada ya que, con frecuencia es necesario que el modelo animal elegido responda de manera predictiva a la respuesta humana a la sustancia ensayada. Por lo tanto la similitud entre humanos y los modelos animales respecto de los mecanismos biológicos implicados, es más importante que la fidelidad del modelo.

Por lo tanto, la importancia del uso de un buen modelo animal, depende de su capacidad para aportar resultados extrapolables a la especie humana o a otras especies animales, y su correcta elección es fundamental (Montero J.L y col, 2008).

Modelos espontáneos

Son modelos espontáneos de una enfermedad humana o animal que aparecen en forma natural obtenidos como consecuencias de variaciones genéticas (mutaciones). Se obtienen por selección entre animales consanguíneos que expresan esa variable o de entre poblaciones en las cuales gran número de animales expresan dicha variable y/o sufren esa enfermedad. Los roedores han sido los pioneros en contribuir a este tipo de modelos dada su plasticidad para lograr individuos genéticamente uniformes. Muchas de estas mutaciones han demostrado ser modelos muy interesantes para entender procesos de desarrollos en mamíferos y algunas de ellas son homologas de enfermedades humanas, por ejemplo alcaptonuria y distrofia muscular, entre otras (Benavidez F. y col., 2003).

La elección de unos de estos modelos para una investigación, no solo radica en el tipo de especie seleccionada sino también en la cepa que se escoja, dado que existen importantes diferencias en parámetros como curvas de peso, longevidad, prevalencia de tumores o comportamientos entre unas y otras. Otra de las consideraciones importantes es desde el punto de vista genético, donde deberemos evaluar si la elección del modelo es conveniente que sea en animales consanguíneos, híbridos o no consanguíneos (Wright K., 1997).

Existe una extensa literatura disponible sobre modelos animales espontáneos, fundamentalmente en rata y ratón y que modelizan condiciones similares a las enfermedades humanas; por ejemplo, los ratones nude inmunodeficientes como modelos para el estudio de tumores hetero trasplantados para oncología, las ratas hipertensas SHR, ratones obesos, ratas diabéticas, etc. Este tipo de animales han sido muy bien caracterizados (<http://www.jax.org>).

Modelos inducidos

Son modelos animales en los cuales las condiciones que han de ser investigadas se inducen de forma experimental.

“Son aquellos donde se induce una enfermedad o un trastorno de forma experimental de forma que se obtiene una similitud con los síntomas y la etiología que aparece en la especie diana”.

Este tipo de modelos son la única categoría que nos permitiría una selección más amplia de la especie animal a utilizar. Mucho tendrá que ver en dicha elección que la patología y el resultado de la enfermedad o trastorno inducido en el modelo se parezca a las lesiones respectivas de la especie objetivo. Cabe acotar también que muchos de los modelos inducidos son parciales, debido a que la etiología de la enfermedad inducida en forma experimental en el animal es diferente a la que se presenta en el hombre (Rollin B. y col., 1990).

La generación de este tipo de modelos se puede realizar por:

1. Manipulación quirúrgica; fue el procedimiento pionero en este tipo de fabricación de modelos, como por ejemplo los modelos de ligaduras de arterias renales, o ligaduras pilóricas, etc.

2. Administración de sustancias biológicamente activas: por ejemplo, la administración de sustancias como la estreptozotocina o aloxano para inducir la diabetes.
3. Administración de dietas modificadas: las dietas con carencias o suplementadas con exceso de alguno de sus componentes naturales, han sido claves para el estudio de enfermedades provocadas por hipovitaminosis, hiperlipidemias, esclerosis vasculares, etc.
4. Cambios etológicos: por modificación de factores sociales o del entorno pueden producir cambios del comportamiento y en muchos casos generan modelos de aprendizaje para estudios de psicofármacos y otras drogas.
5. Manipulación genética: es tal vez la herramienta más valiosa hoy día, ya que permite obtener modelos especiales que permiten comprender los mecanismos de acción patológicos y terapéuticos. Los modelos modificados genéticamente (MMG), animales transgénicos y knockout, son los más importantes en número de modelos generados, principalmente en ratones, peces y animales de granja. Se han desarrollado muchos modelos para enfermedades importantes desde que esta tecnología ha sido accesible y ha permitido entender enfermedades complejas de origen multifactorial, o interacciones entre genes, y entre genes y ambiente (Benavidez F. y col., 2003).

Extrapolación de resultados

Cuando se han logrado resultados experimentales a través del empleo de un modelo animal, estos deben validarse con la especie de interés.

La extrapolación es el término que se usa para describir cómo esos datos obtenidos de un estudio con animales pueden ser aplicados en otra especie animal o en el hombre.

La extrapolación se realiza de dos maneras:

Extrapolación cualitativa: cuando un modelo animal presenta respuestas a estímulos que se reproducen en otras especies animales y en la especie humana.

Extrapolación cuantitativa: cuando un modelo animal permite discriminar los efectos de diferentes dosis de un determinado producto y después estas dosis son aplicables o tienen efectos idénticos en otras especies o en el hombre.

No se pueden dar reglas generales confiables para la validez de una extrapolación de una especie a otra. Esto debe ser evaluado individualmente para cada experimento y solo a menudo puede ser verificado después de muchas pruebas en la especie objetivo (Calabrese E., 1983)).

Requerimientos generales

Para evitar errores cometidos en el pasado y vencer las dificultades en el futuro, debería tenerse en cuenta lo siguiente a la hora de extrapolar resultados obtenidos (Kornetsky C, 1997).

Realizar una aproximación empleando diversas especies animales: la mayoría de las autoridades sanitarias de control de los distintos países requieren al menos dos especies diferentes para ensayos de toxicidad, y al menos una de ellas no debe ser una especie roedora, aunque eso tampoco da garantía de realizar una extrapolación acertada de los resultados.

Los resultados que indiquen ineficacia o nocividad en la especie animal no significan que se reproducirá de la misma manera en el hombre y viceversa. Por ej: la penicilina es fatal en cobayos, pero no en humanos. La aspirina es teratogénica en gatos, perros, ratas, ratones y monos, pero no en mujeres embarazadas. La talidomida que generó innumerables casos de malformaciones en niños, no producía efectos teratogénicos en ratas ni otras especies, pero si en monos.

Una relación filogenética cercana o la semejanza anatómica no es garantía de procesos bioquímicos idénticos, por eso es necesaria la prueba en más de una especie animal racionalizando su uso.

Modelos metabólicos y tamaño del animal: la base de la utilización de un animal de laboratorio como modelo animal para estudiar alguna problemática en el hombre u otros animales, está dada por las similitudes de las características biológicas entre estos y es así como pueden ser comparados. No obstante, eso, la diferencia en tamaño entre las especies, por ejemplo, ratón y el hombre es algo que se debe tener en cuenta, y es justamente el tamaño corporal al que se debe hacer referencia cuando por ejemplo comparamos el tamaño de órganos.

Los órganos involucrados en alguna actividad metabólica como por ejemplo el hígado representan una parte significativa del peso corporal, ej: 75%. Es por esta razón que se recomienda que las dosis de los compuestos usados se refieran a peso metabólico = peso corporal ^{0.75}.

Diferencias interespecíficas: debe tenerse en cuenta las diferencias existentes de la variable a estudiar y las interespecíficas propias de cada especie como cepa, genotipo, fenotipo, sexo, edad, ritmos circadianos, actividad, cambios estacionales, etc.

Diseño experimental y la situación real de cada especie a la que se pretende extrapolar los resultados: Las condiciones ideales de laboratorio no representan las de la vida real de aquella especie animal o de la especie humana que recibirá el fármaco experimental o el procedimiento ensayado; por lo tanto, en todo diseño experimental se deberá reproducir al máximo la situación real y todo fármaco aplicable a la especie humana deberá finalmente probarse en ella.

Bienestar del animal durante la experiencia: debe asegurarse el bienestar del animal durante toda la experiencia, dado que la falta de confort, producto del estrés debido al procedimiento experimental, pueden conducir a enmascarar los resultados por la sustancia administrada o a la manipulación producida.

Referencias

- Benavides F, Guenet J.L. 2003. Los roedores de laboratorio como modelos de enfermedades humanas. Manual de genética de roedores de laboratorio IX. Univ. de Alcalá.
- Calabrese E. 1983. Principles of Animal Extrapolation. Wiley, NY.

<http://www.jax.org>

- Kornetsky C. 1997. Animal Model: promises and problem. In animal Models in Psychiatry and Neurology. Pergamon Press.
- Montero J.L., Tur Mari J., Romero Vidal A. 2008. Modelos animales. Ciencia y tecnología del animal de laboratorio, Vol I. SECAL
- Rollin B. and Kesel M. 1990. The experimental animal in biomedical research, vol I. CRC Press. Boca Ratón.
- Svendsen P, Hau J, 1994. Eds. Handbook of Laboratory Animal Science, Vol. II, Animal Models. Boca Ratón, FL: CRC Press, Chapter 1. Google Scholar. 7.
- Van der Gulden W., Beynen A., Hau J. 1993. Modelos animales. Principios de la ciencia del animal de laboratorio. Elsevier.
- Wright K. 1997. Working with laboratory animals: general principles and practical considerations. Journal of Vascular. 363 – 373.

CAPÍTULO 23

Diseño experimental

Alicia Graciela Antonini

En todo diseño experimental con el fin de llevar adelante un ensayo del que puedan obtenerse resultados que permitan aceptar o rechazar una hipótesis dada, se deben considerar una serie de factores referidos a las características del ensayo en sí mismo y a la metodología estadística a utilizar. Pero cuando se trabaja con animales, ya sea de laboratorio, destinados a la producción animal o de compañía, requiere de un cuidadoso diseño que sea capaz de suministrar información de calidad, a través de resultados confiables, que permitan comprender mejor un suceso biológico, evaluar diferentes respuestas a tratamientos, conocer características particulares de una especie, etc., utilizando el menor número de individuos posibles y teniendo en cuenta su bienestar.

Por esta razón un experimento siempre tendrá un marco teórico que sustente la planificación técnica, un protocolo de seguimiento, un análisis estadístico consecuente con el diseño y una interpretación acorde con la potencia de los resultados.

La realización de un ensayo biológico implica la presencia del error experimental, es decir no es posible controlar todos los factores que intervienen en un experimento de manera de eliminarlo completamente. Este error experimental tiene varios componentes algunos inherentes al operador y a los sistemas de medición, otros al método estadístico a aplicar y por último factores aleatorios que pudieran acontecer durante el desarrollo del experimento (Corva et al, 2009).

La toma de datos por más de un operador suele ser un factor importante en el aumento de la variabilidad observada, los instrumentos de medida, desde una balanza o cinta métrica hasta un espectrofotómetro, que tendrán su propio margen de error, pueden aumentar el error experimental y es particularmente importante considerar el caso de mediciones subjetivas, como pueden ser la condición corporal o el temperamento asignado a un animal donde se deberá tener en cuenta el uso de paneles de evaluadores.

Existen estrategias metodológicas para disminuir este error relacionadas con las técnicas a utilizar, la homogeneidad de las unidades experimentales, el uso de bloques, la inclusión de covariables, diseños multifactoriales, repeticiones, etc.

Hay dos tipos de errores presentes en todo ensayo que describiremos de manera sintética a través del siguiente cuadro y son el Error de tipo I o α y el Error de tipo II o β , sus probabilidades pueden considerarse como los riesgos de tomar decisiones incorrectas. Ambos errores se encuentran estrechamente relacionados y varían inversamente (Sokal et al, 2013; Spiegel, 1993; Steel et al, 1996a).

		Realidad	
		H_0 verdadero Falso	H_0 Falso H_1 verdadero
Decisión que toma el investigador	Acepto H_0	Acierto	Error β O De Tipo II
	Rechazo H_0	Error α O De Tipo I	Acierto (Potencia Θ)

Figura 1: Cuadro descriptivo de los errores posibles en una prueba estadística

Es importante considerar que en todo experimento habremos fijado un límite para el Error de Tipo I o α que puede ser del 0,10; 0,05; 0,01; 0,001, etc., que llamaremos nivel de significación. Si bien esta decisión es arbitraria, en general, de manera convencional, se acepta un error de 0,05 (Corva et al, 2009; Sokal et al, 2013; Y-Lun Chou, 1993). Esto significa que acepto que cada 100 veces que se repita el ensayo, en 5 oportunidades se estará rechazando una hipótesis nula cuando es verdadera. Siempre que se estén evaluando efectos tóxicos de una sustancia se recomienda la utilización de valores menores para el Error de Tipo I o α .

Población y muestra

Toda investigación se lleva adelante en un contexto poblacional, es decir hay una población (o universo) objeto de estudio (Steel et al, 1996b; Wayne, 2017)). Esta población puede ser infinita o finita, en el primer caso está claro que sería imposible estudiarla en su totalidad, pero también, en el segundo caso, existen razones prácticas, económicas, operativas, etc que hacen necesaria la toma de una muestra a partir de la cual se estimarán parámetros poblacionales (Ej. Evaluación de parámetros sanguíneos de un individuo a través de la extracción de una pequeña cantidad de sangre).

A partir de una muestra se podrán estimar medidas descriptivas (media, varianza, frecuencias, etc) y posteriormente inferir parámetros poblacionales (μ ,) comparar poblaciones, relacionar variables, etc. (Macchi, 2013).

Por esta razón la muestra deberá cumplir con dos condiciones: debe ser representativa y probabilística. Representativa porque todas las formas alternativas de la variable en estudio deberán estar representadas en una proporción similar a la que se encuentran en la población, y, probabilística, porque todos los individuos, células, establecimientos, etc de la población deberán tener las mismas probabilidades de ser elegidos para integrar la muestra.

POBLACION O UNIVERSO



Tamaño de la muestra

Debemos considerar que no se puede analizar a la población en estudio, sino que todo experimento se realiza a través de una muestra y que, a partir de ella se estimarán parámetros poblacionales y se tomarán decisiones. Por esta razón es muy importante determinar de manera correcta el tamaño de esa muestra.

No sólo hay argumentos estadísticos que consideraremos más adelante sino criterios éticos que nos obligan a ser lo más rigurosos posibles en este punto.

Los criterios éticos se fundan en el respeto por la vida en todas sus formas llevando a evitar sufrimiento y/o muertes evitables. Debemos tener en cuenta que un ensayo realizado con un número de animales menor al necesario para identificar diferencias significativas no permitirá

obtener resultados válidos y por lo tanto ese ensayo deberá repetirse y los animales utilizados habrán sido sacrificados inútilmente.

El tamaño de la muestra depende de varios factores que se deben conocer previamente relacionados por un lado con la población en estudio y por el otro con el tipo de variable que se pretende analizar y su distribución:

- a. Variabilidad de los registros en una determinada población
- b. Frecuencias de las variables
- c. Representatividad de los datos incluidos en la muestra
- d. Nivel de confianza
- e. Precisión
- f. Tipo de variable
 - a. Cuanto mayor es la variabilidad de los datos obtenidos en una determinada población, mayor deberá ser el tamaño muestral para evitar que por azar la muestra no incluya valores extremos lo que llevará a una descripción equívoca al inferir los valores poblacionales a partir de los muestrales. Ej.: El antiguo refrán “para muestra basta un botón” es válido dada la homogeneidad del “comportamiento” de la variable, es decir se espera que todos los botones sean iguales por lo que un único botón sería suficiente para representar al resto.
Diferente situación sería tener una caja de caramelos con 20 variedades distintas y pretender probar todas ellas tomando sólo 5 caramelos.
 - b. En los casos en que se estudien fenómenos que aparecen en frecuencias muy bajas, éstas determinarán un aumento significativo en el tamaño de muestra. Ej.: Si una determinada patología de origen genético se observa en 1 de cada 1.000 nacimientos, en una muestra de 100 individuos habría una alta probabilidad de no detectar ningún nacido con la mencionada patología. Una conclusión equivocada sería asumir que esa patología no existe en la población analizada.
 - c. Cuando la variable se comporte de manera diferente bajo ciertas condiciones, todas ellas deberán ser representadas de manera proporcional. Ej.: Si sabemos que el número de crías nacidas totales no es igual en hembras multíparas primíparas respecto de su segundo parto en adelante y se desea conocer el promedio de crías nacidas por hembra en un establecimiento, se deberá incluir de manera proporcional información proveniente de hembras de primer parto y de segundo parto en adelante. Utilizar información proveniente sólo de alguno de los dos grupos subestimaré o sobreestimaré la productividad total del establecimiento.
 - d. El nivel de confianza se establece habitualmente en el 95% a través del valor normalizado (z) que corresponde a 1,96.
 - e. La precisión es un valor arbitrario que define un intervalo aceptable para la media o frecuencia de la variable.
 - f. El tipo de variable definirá los parámetros a utilizar en la fórmula de cálculo

Cálculo del tamaño de la muestra para variables cualitativas y cuantitativas

Para variables cualitativas (Corva et al, 2009):

$$n = \left(\frac{z}{c} \right)^2 \times (p \times q)$$

n = Tamaño de muestra
z = Nivel de confianza
c = Certeza
p = probabilidad de ocurrencia
q = antiprobabilidad

Para variables cuantitativas (Corva et al, 2009):

$$n = \left(\frac{z \times S}{c} \right)^2$$

donde,

n = Tamaño de la muestra
z = Nivel de Confianza
c = Certeza
S = Desvío estándar

Prueba piloto

Cuando se describen las fórmulas de cálculo para el tamaño de la muestra y en ambos tipos de variables observamos que el nivel de confianza se fija generalmente en el 95% ($z=1,96$) y la certeza es arbitraria fijada por el investigador. Sin embargo, tanto los valores de probabilidades para las variables cualitativas cuanto el valor del desvío estándar para las variables cuantitativas se refiere a la población en estudio.

Cuando se conoce la incidencia de una determinada patología o la variabilidad de la población respecto a una característica dada esta información será trasladada a la fórmula de cálculo.

Sin embargo, si no existe información a priori, se deberá realizar una prueba piloto que permita conocer, al menos de una manera aproximada, estos estimadores.

Es interesante el origen etimológico de estas palabras ya que “prueba” viene del latín y significa bueno y “piloto” del griego y significa timón. De alguna manera los datos obtenidos a partir de esta prueba serán el timón que nos permitirá establecer la dirección que deberemos tomar en función del cálculo del tamaño muestral.

Se trata de un ensayo experimental o primera aproximación al conocimiento del comportamiento de una determinada variable en una población a partir de un número reducido de individuos.

Técnicas de muestreo

Como ya se mencionó la variable en estudio puede o no comportarse de manera diferencial bajo ciertas circunstancias, por esta razón existen diferentes técnicas de muestreo que permiten facilitar la representatividad de la muestra.

Existen dos tipos de muestreos, probabilísticos y no probabilísticos. Dentro del primer grupo se pueden mencionar los muestreos aleatorios simples, estratificados, por conglomerados y polietápicos. En el segundo grupo se encuentran los muestreos por conveniencia y dirigidos.

En los casos en que la variable se comporte de modo similar bajo diferentes condiciones el muestreo por aleatorización simple es práctico, sencillo y útil. Consiste en la toma de los datos al azar (sorteo directo, números aleatorios obtenidos computacionalmente, etc.) sin ningún tipo de consideración adicional.

Cuando de la observación de la variable surge un comportamiento diferencial bajo ciertas condiciones, se deberá tomar información proporcional para permitir que todas las condiciones estén representadas, a este tipo de muestreo se lo conoce como muestreo estratificado. Dentro de cada estrato se tomará información utilizando alguna técnica de aleatorización.

Otro tipo de muestreo es el muestreo por conglomerados donde se reconocen conjuntos similares y sólo se estudian algunos de ellos. La determinación de cuáles de ellos serán evaluados siempre deberá ser de manera aleatoria.

Por último, podemos mencionar aquellos muestreos polietápicos o por etapas que se realizan partiendo de algunos conglomerados tomados al azar, que se consideran las unidades muestrales primarias y a partir de ellas submuestras sucesivas de estratos con menor grado de complejidad

Existe como técnica de muestreo aquella denominada por conveniencia. A modo de ejemplo se puede considerar que se desea conocer el nivel de contaminación de los ríos de la provincia de Buenos Aires y se decide “por conveniencia” tomar muestras de agua de los arroyos que se encuentran a una distancia no mayor de 50 km del laboratorio donde serán procesadas. Esta técnica, si bien es válida, pocas veces es representativa de la población, y puede llevar a cometer errores de diagnóstico.

Algo similar puede suceder en el caso de los muestreos dirigidos donde el investigador decide qué individuos participan del experimento. Esta técnica se suele utilizar cuando se incluyen en el estudio animales enfermos que debido a la baja frecuencia de la patología sería poco

probable incluirlos por azar en una muestra reducida de individuos. Un ejemplo de muestreo dirigido es la elección de ciertos músculos para la determinación de presencia de *Trichinella spiralis* en cerdos a partir del conocimiento que se tiene sobre su ubicación más frecuente.

Diseño de experimentos

Todo experimento parte de una hipótesis que se desea probar o rechazar, es decir existe alguna evidencia empírica que lleva al investigador a plantearse teorías y preguntas que espera sean dilucidadas a través de los resultados obtenidos.

Si la planificación del experimento tiene errores metodológicos los resultados no darán respuestas satisfactorias o, peor aún, darán respuestas que se creerán ciertas cuando no lo son porque se originan en falsos supuestos.

Por esta razón, para diseñar un experimento debemos considerar al menos cuatro aspectos:

1. Definición de las unidades experimentales
 2. Tipo de variable a estudiar
 3. Tipo de distribución de la variable
 4. El tipo de análisis a realizar
 - a. Descripción de variables
 - b. Comparación entre grupos
 - c. Relación entre variables
1. En estos ensayos la unidad experimental es siempre el animal. Se debe tener especial atención en aquellos estudios celulares (ya sea de cultivos de tejidos provenientes de animales, células tumorales implantadas, etc) ya que, si bien el objeto de estudio es la célula y su condición, no podrán todas provenir del mismo individuo.
- Las unidades experimentales no podrán representar de manera aislada un determinado tratamiento o condición ya que quedarían confundidos estos tratamientos con el impacto idiosincrático del individuo.
2. Las variables a estudiar pueden clasificarse en dos grandes grupos, variables cualitativas y variables cuantitativas, éstas últimas pueden ser discretas o discontinuas o continuas. Definir correctamente el tipo de variable a estudiar determina a priori la metodología a utilizar.
- Las variables cualitativas (cuyas variantes tienen diferencia de calidad, por ejemplo: color de pelaje, preñada/vacía, aborto si/no, etc.) pueden ser descritas a través de sus frecuencias, mientras que el método de Ji-cuadrado compara grupos entre sí o relaciones entre variables.
- Las variables cuantitativas (cuyas variantes son de cantidad y tienen infinitos valores entre los extremos, por ejemplo: peso, altura, ganancia diaria, intervalo parto concepción, etc.). En este caso las descripciones podrán realizarse a partir de las medidas de tendencia central (media, mediana y moda) y de dispersión (varianza, desvío estándar, rango, error estándar). Para la comparación entre grupos podrá utilizarse la Prueba t de Student o el Aná-

lisis de Varianza y las relaciones entre variables podrán estimarse a través de una Prueba de Regresión.

3. Distribución de la variable

La distribución de las frecuencias de la variable puede ser Normal, Binomial o de Poisson (Spiegel, 1993; Sokal et al, 2013). Las variables cuantitativas con distribución normal permitirán la utilización de métodos paramétricos como los mencionados en el punto 2.

Cuando la distribución tenga un sesgo significativo se podrán considerar dos alternativas:

- Transformar la variable de modo que normalice su distribución
- Utilizar pruebas no paramétricas (Ji-cuadrado; Wilcoxon, Kruskal-Wallis, etc.)

4. El tipo de análisis a realizar determinará la prueba estadística a utilizar una vez considerados tanto el tipo como la distribución de la variable.

Toda prueba estadística tiene supuestos a considerar que de no cumplirse impedirán su uso, ya que los resultados son seriamente distorsionados y como consecuencia se llega a conclusiones erróneas.

Tomemos como ejemplo el Análisis de Varianza (Sokal et al, 2013; Steel et al 1996a) para el caso de un factor y efecto fijo (Modelo I) donde,

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_j + \epsilon_{ij}$$

Y_{ij} = registro del i-ésimo individuo que recibió el j-ésimo tratamiento

μ = media general

α_j = efecto del j-ésimo tratamiento

ϵ_{ij} = error del experimento

- a. Los datos deben distribuirse normalmente con $\mu=0$ y $\sigma^2=1$
 - b. Las observaciones deben ser independientes entre sí
 - c. Las varianzas deben ser homogéneas (homocedasticidad)
- a. Observar en una distribución valores de sesgo estandarizados mayores a 2 y menores a -2 que muestran el desplazamiento de la curva a derecha o izquierda de la media o valores de curtosis estandarizada mayores a 2 y menores a -2 que ponen en evidencia una gran dispersión de los datos alrededor de la media, serían indicadores claros de distribuciones no normales. Las pruebas de Kolmogorov-Smirnov o Shapiro-Wilks son las más utilizadas para verificar la normalidad de la distribución.
 - b. El caso más frecuente en el análisis de datos no independientes es cuando se obtiene información de individuos emparentados, registros del mismo individuo en distinto momento, etc. La distribución aleatoria de los residuos es un buen indicador de distribución independiente de los datos.
 - c. La prueba Levene que utiliza el estadístico de Fischer permite evaluar la homogeneidad de varianzas entre grupos.

Como ya se mencionó anteriormente, determinar que alguno de estos supuestos no se cumple llevará inevitablemente a replantear el tipo de prueba a utilizar. En el caso de distribuciones no normales se deberá transformar la variable o utilizar pruebas no paramétricas y en el caso de dependencia entre las observaciones se podrá hacer uso de diseños más complejos que permitan la identificación de estos efectos como en el caso de los análisis multivariados o a través del uso de covariables.

Referencias

- Corva, S.G., Silvestrini, M.P. Antonini, A.G. (2009) *Manual de Bioestadística Veterinaria*. La Plata. Ed. ProvetSur.
- Macchi, R.L. (2013). *Introducción a la estadística en Ciencias de la Salud*. Buenos Aires, Argentina. Ed. Panamericana
- Sokal, R.R. y Rohlf, F.J. (2013) *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. New York, USA. New York University.
- Spiegel, M.R. (1993) *Estadística*. España. Ed. McGraw-Hill.
- Steel, R.G., y Torrie, J.H. (1996) *Bioestadística. Principios y Procedimientos*. México Ed. McGraw-Hill.
- Steel, R.G., Torrie, J.H. Dickey, D.A. (1996) *Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach*. Ohio, USA. Ed. McGraw-Hill.
- Wayne, D. Bioestadística. (2017) *Base para el análisis de las ciencias de la salud*. USA. Ed. L. Wiley
- Ya-Lun Chou. (1993) *Análisis estadístico*. México. Ed. McGraw-Hill.

CAPÍTULO 24

Gestión de bioterios

Fabrizio Maschi y Pilar Cagliada

Gestión o gerenciamiento de un bioterio

La gestión es el arte y la ciencia de utilizar los recursos de manera eficiente y efectiva para lograr metas. Lo más difícil es saber elegir a la persona adecuada que lo pueda llevar adelante.

El criterio más importante para ser gerente de un bioterio (o de cualquier otra instalación) es que se espera que la persona establezca objetivos que puedan afectar significativamente las operaciones de las instalaciones para animales y que tenga la autoridad para usar todas o algunos de los recursos de su organización (como dinero o el personal) para alcanzar los objetivos. Si alguien reúne esas condiciones, entonces tiene la competencia para desempeñarse como gerente.

No hay que focalizar en los títulos. Puede llamarse director de la instalación, gerente de operaciones, supervisor del cuidado de animales, asistente administrativo o cualquier designación de este tipo.

La pregunta no es cuál es su título; sino preguntarse si tiene la autoridad para usar recursos que permitan para alcanzar objetivos que puedan afectar significativamente a la organización.

Si se tiene autoridad para contratar a un nuevo personal, se ha controlado al menos un recurso (personal) y eso puede tener un impacto significativo en las operaciones organizacionales. Si la autoridad incluye tomar decisiones de compra para la instalación de animales, entonces se tiene control sobre otro recurso (dinero). En cualquier caso, se ha cumplido el criterio básico para ser categorizado como gerente.

Desafortunadamente, no todas las personas con el título de gerente son realmente gerentes. Se considera como tal aquel cuya responsabilidad principal es asegurarse de que el animal este en forma adecuada, tenga bienestar y que los técnicos que los cuidan estén haciendo el trabajo asignado de manera eficiente y efectiva. Si esa persona requiere de la aprobación de una autoridad superior dentro del bioterio para reasignar a un empleado a un área diferente, proponer un aumento de sueldo, enviar una carta de amonestación, aprobar o establecer el tiempo de descanso, iniciar un pedido de compra o cancelarlo, entonces tenemos que preguntarnos sobre la capacidad que tiene el gerente, para resolver problemas, usar recursos y tomar decisiones importantes que pueden afectar las actividades del bioterio. Esa persona puede ser un supervisor muy talentoso, pero no reúne las competencias necesarias para desempeñarse como gerente.

Hay muy pocas personas que tienen la capacidad espontánea para ser gerentes. De hecho, se ha dicho que solo uno de cada diez tiene esta condición innata.

La buena noticia es que la gestión se puede aprender. La mala noticia es que es necesario ser diligente para aprender esta función. En verdad, ser gerente requiere de una fuerte dedicación horaria, de manera que, si no se dispone de tiempo suficiente, no deberá esforzarse por convertirse en uno ya que tiene que disfrutar de su trabajo para poder tener éxito (Silverman J., 2017).

De la estructura de la organización

Quizás, para algunas instalaciones de animales de laboratorio, no es necesaria una estructura piramidal y otras formas de liderazgo gerencial podrían funcionar, pero para muchos otros, la pirámide es adecuada. Con una organización en pirámide hay líneas claras de responsabilidad; ayuda a tomar decisiones, asignar recursos y manejar recursos humanos. El lado negativo, es que existe la posibilidad de que el gerente quede aislado de los empleados, que tenga una modalidad dictatorial, o reprima la creatividad del personal. Si se está de acuerdo o en desacuerdo sobre el uso de una jerarquía clásica, en caso de estructurarse como una pirámide, entonces dependerá del gerente, asegurarse de que poder hablar con cualquier persona sin requerir del permiso de alguien. Esto es parte de una "democracia autoritaria" en la que los gerentes utilizan su autoridad para crear una gestión orientada a las personas que integran el sistema. En estos casos se sabe cuándo socializar y cuándo no (Jori K. y col. 2017). Hay que tener en cuenta que una pirámide no se sostiene con una punta de oro y una base de arena.

Recursos que se deberán administrar

- **Recursos humanos (personal)**
- **Recursos fiscales (dinero, aspectos financieros)**
- **Recursos de capital (equipo principal y planta física)**
- **Recursos de información**
- **Tiempo**

Recursos humanos

Los recursos humanos son el corazón y el alma de un negocio. En el manejo de animales de laboratorio, los recursos humanos son todas las personas cuyo trabajo afecta el funcionamiento de una instalación de animales de laboratorio, no solo veterinarios y técnicos. Esto incluye archivistas, recepcionistas, químicos, proveedores de alimentos y cualquier otra persona, dentro o fuera de su organización, a quien se pueda convocar para ayudar a alcanzar un objetivo específico.

Recursos fiscales

Los recursos fiscales son los fondos que la organización tiene o puede obtener. En un laboratorio o bioterio, puede ingresar dinero cobrando a los investigadores por el mantenimiento de sus animales, mediante el apoyo directo de la institución de pertenencia, cobrando por servicios diversos, como el uso de una sala de cirugía, mantenimiento de animales de otros institutos o investigadores, y a través de otras posibilidades comunes en las instalaciones de animales de laboratorio.

El inventario de jaulas y suministros también puede considerarse como recurso fiscal ya que, en teoría, se puede vender para obtener dinero. La institución a la cual pertenece la instalación puede adquirir algunos de sus recursos mediante subsidios del gobierno, de la venta de productos, inversiones, préstamos, y de otras maneras.

Recursos de capital

Los recursos de capital de la organización son el edificio en el que trabaja, los terrenos que ocupa el edificio y los equipos principales, también llamados equipos pesados, que respaldan las actividades (como una máquina de rayos X digital o una lavadora de jaulas, o un autoclave de frontera).

Recursos de información

Cuando pensamos en los recursos que tiene una organización, es probable que no se considere la información como uno de ellos. Sin embargo, esta representa recurso real y valioso que todos utilizan a diario. Algunos ejemplos de los recursos de información son registros de salud del animal, censos de animales, correos electrónicos, la World Wide Web, los registros necesarios para cumplir con las agencias reguladoras, la biblioteca, reuniones profesionales y representantes de vendedores, etc. En el último ejemplo (representantes de proveedores), se puede apreciar fácilmente que no hay una línea clara de dónde termina un recurso y comienza otro, ya que estas personas pueden considerarse como recursos humanos y de información (Gentile F., 2011).

Tiempo:

Al igual que con la información, la mayoría de nosotros no consideramos el tiempo como un recurso. No solo el tiempo es un recurso, también es un recurso limitante porque solo hay 24 horas en un día. Parte del trabajo es utilizar el tiempo de la manera más eficiente y efectiva posible. Se puede usar el tiempo para programar un número óptimo de cirugías, para comenzar nuevos experimentos, tener reuniones de personal y capacitación en el trabajo. Hay muchos gerentes novatos que creen que necesitan un día de 25 horas, y hay algunos otros que desean que su personal dedique el 110% de su tiempo al trabajo. El tiempo (además de las personas) tiene que administrarse.

Conociendo estos cinco recursos, es interesante preguntar ¿de qué le servirá? ¿Qué va a hacer con ellos? ¿Qué tienen que ver con la actividad como gerente? Son algunas preguntas

que surgen y esta sería la respuesta: el trabajo de un gerente es utilizar estos cinco recursos de manera eficiente y efectiva para alcanzar una meta. Los recursos son las herramientas básicas con las que trabaja un gerente. En la gran mayoría de los casos, utilizará más de un recurso a la vez. De hecho, no se puede gestionar eficazmente una instalación de animales utilizando solo uno de ellos, como tampoco es posible construir una casa usando solo una herramienta. “Los buenos gerentes planifican, organizan, dirigen, controlan y toman decisiones sobre cada uno de los recursos que utilizan”.

Bases para una buena planificación

Proceso de planificación general

1. Se deben definir sus objetivos y saber cómo y cuándo es alcanzado.
2. Determinar los recursos necesarios para lograr la meta.
3. Desarrollar estrategias (métodos específicos) para alcanzar la meta.
4. Asignar a las personas para que sean responsables de cada estrategia.
5. Controlar el progreso hacia alcanzar la meta y realizar los cambios necesarios en el plan.

Organización de los recursos humanos

Los recursos humanos pueden estar distribuidos en distintos tipos de ambientes relacionados con los animales de investigación. Puede ser una unidad de investigación, un bioterio de producción y provisión de animales, un centro de experimentación y servicios, o situaciones mixtas.

Unidad de Investigación

La unidad de investigación es aquella integrada por un grupo de personas junto con el equipamiento necesario dentro de un área, que ejecuta alguna tarea de investigación o brinda un servicio determinado. Esta unidad puede ser, un grupo, un departamento, un área específica como por ejemplo un bioterio, una cátedra, un instituto, un centro o un laboratorio; que a su vez puede interrelacionarse con otros grupos de trabajo. Su denominación depende en parte del tamaño y sus subdivisiones, y van constituyendo la organización del lugar. En las unidades académicas los departamentos generalmente están constituidos por cátedras y/o laboratorios, los cuales están integrados por más de un grupo de trabajo, dirigidos por un director que representa la dirección general o la unidad de investigación. En cambio, en el ámbito privado, los departamentos, los dirige un jefe que asume totalmente la responsabilidad administrativa y científica.

En general no hay dimensiones ideales de una unidad de investigación ya que esto depende del tipo de organización que se tenga, de la cantidad de subunidades con que se cuente y sobre todo del volumen de trabajo y los plazos para cumplir con ellos. También es importante de la interrelación con otros departamentos o servicios, en caso de tener que tercerizar o subcontratar alguna parte de las pruebas o ensayos que se realizan. Tanto la falta como el exceso

de personal siempre son perjudiciales para lograr el objetivo. Independientemente de ello, es fundamental e imprescindible contar con una jerarquización dentro de la unidad, y que las personas responsables cuenten con autonomía para tomar decisiones que permitan el buen funcionamiento operativo.

Actualmente se sabe que las interrelaciones con otras unidades son cada vez más importantes y hasta vitales para coordinar proyectos en conjunto, dada la complejidad que van adquiriendo los ensayos con el avance de la ciencia (Zúñiga JM., 1997).

Estructura de las unidades

Existen distintas posibilidades respecto a la organización de las unidades de investigación y ello dependerá fundamentalmente del tamaño de la organización, del tipo de servicio a prestar y de las líneas de investigación que se generen y/o de los proyectos que se persigan.

Por especialización

Es una de las formas más tradicionales de agrupación, basada en el tipo de trabajo que desarrollan, se dividen los distintos equipos de trabajo. De esta manera son los departamentos o áreas que ofrecen diversos servicios, por ejemplo, producción de animales, producción de transgénicos, control sanitario, microbiología, toxicología, patología, diagnóstico por imágenes, etc.

Esta forma de agrupación conlleva a que cada sector adquiera un alto grado de especialización y que pueda dar una mirada integral y enriquecedora de las diferentes líneas de investigación en que participan. Sin embargo, si estas áreas realizan actividades en continuidad una con otra, la saturación de trabajo en una de ellas podrá entorpecer el trabajo de las restantes. Por eso es sumamente necesario que la coordinación esté muy bien dirigida.

Por líneas de investigación o proyectos

En este caso la integración de los grupos es por el objetivo del trabajo y no por la especialización del personal. Puede haber distintos especialistas para formar parte de un mismo proyecto; tiene una mirada más interdisciplinaria. Lo bueno de este tipo de organización es que cada proyecto es autónomo, su desarrollo no depende de otros proyectos y la información es fluida entre todos los integrantes por lo que habrá mayor objetividad en las opiniones sobre el tema en estudio.

Situaciones mixtas

Es una fusión de los dos sistemas mencionados anteriormente. Es muy útil cuando el proyecto involucra a especialistas de ambos tipos y fundamentalmente si su participación es necesaria en alguna fase del estudio en particular.

Categorías de personal y responsabilidades

Según Boisvert C. (2006), es muy importante y necesario definir las categorías profesionales y sus responsabilidades de acuerdo con sus puestos de trabajo dentro de la organización. Entre las categorías se encuentran:

1. **Director general del centro o de investigación**, bajo cuya responsabilidad estarán los aspectos gerenciales, científicos y equipos del centro. Es quien tomará en última instancia todas las decisiones. Estas podrán definirse aisladamente o en consenso con un grupo asesor del directorio.
2. **Directores intermedios** con responsabilidades en las distintas áreas, los que también pueden ser investigadores del proyecto que se está realizando. En un escalón más abajo estarán los **jefes de departamentos o investigadores principales o directores de estudio** quienes llevarán a cabo la dirección de los proyectos, estudios o ensayos y que pueden tener a cargo personal técnico o científico que colaboran con responsabilidad intermedia. En el caso del Bioterio, con la aparición de técnicas cada vez más complejas y específicas, como por ejemplo producción de animales transgénicos, trasplante y congelación de embriones, transferencia embrionaria, etc., se hace necesario que éste personal se encuentre cada vez más capacitado y entrenado.
3. **Personal administrativo** es fundamental para las tareas del centro o bioterio. Además, pueden ser idóneos para otras actividades como organización de archivos, documentos u otros.

Si bien la jerarquización es imprescindible, las interrelaciones que se establezcan entre las áreas son fundamentales. Para que el trabajo sea eficaz debe existir un buen equilibrio entre las decisiones de cada profesional y las que se deben tomar en forma consensuada. Si hay un exceso de poder o si deben reunirse continuamente para discutir las diferentes etapas del ensayo o los pequeños inconvenientes que se vayan presentando, llevará a pérdida de tiempo, desgaste innecesario y no se logrará el objetivo deseado.

Las decisiones que se tomen deben ser lo más racionales posible, tanto en el sector público como en el privado, teniendo en cuenta las necesidades y las posibilidades presupuestarias del momento, que varían en cada unidad debido a sus características particulares.

Lo más importante que se debe tener en cuenta para comenzar un estudio o ensayo es, primero, el número de personas que posee la unidad, su calificación y entrenamiento; luego, si las instalaciones son las adecuadas para realizar ese ensayo (laboratorios, equipamiento, áreas estériles de ser necesarias, área de mantenimiento de animales, cuarentena, quirófano, etc.) y por último si cuenta con la disponibilidad y los equipos adecuados. Se deberán evaluar las ventajas y desventajas, priorizando siempre la finalidad del proyecto. De no contar en su totalidad o en parte con lo exigido para el ensayo hay que plantear la necesidad de realizarlo en otro centro que disponga de lo necesario para hacerlo; ya sea todo el ensayo o solo una parte de él.

Hay ensayos que requieren técnicas de alto grado de especialización, con equipos muy costosos y una capacitación específica del personal. Se analizará la elección de ese centro de acuerdo a las capacidades y disponibilidad económica, este puede ser público o privado. Por lo general los centros privados ofrecen garantías por ser inspeccionados y acreditados periódicamente. En el sector público, si bien se encuentran las capacidades de equipamiento y personal, pueden alargarse los plazos ya que las gestiones son más complejas sobre todo para obtener la aprobación previa del ensayo, protocolos, contratos, secreto de confidencialidad entre las partes. También puede darse la relación entre Universidad y centro privado o entre diferentes Universidades que ofrezcan garantía de gestión y control de calidad necesarias para el ensayo.

Cuando un centro, bioterio o laboratorio proyecta un nuevo trabajo que signifique crecimiento hacia otras áreas de conocimiento, o decide lograr la acreditación de una normativa específica, o cuando debe conseguir nuevas fuentes de financiamiento; lo que se plantea es una posible relación y/o fusión con otros centros de investigación o inclusive con empresas privadas. Estas alternativas permiten mediante la obtención de fondos importantes, realizar la ampliación del centro e incorporar equipos costosos, lo que permite alcanzar los objetivos planteados y un crecimiento en conocimiento y desarrollo que de otras maneras serían muy difíciles de lograr.

Para lograr esto se debe considerar:

El número de personas calificadas y capacitadas con que cuenta el laboratorio para llevar adelante los proyectos.

La disponibilidad de zonas específicas como son las áreas de experimentación, áreas estériles, zonas de servicio, cuarentenas, salas de archivo, laboratorios, etc. para adecuarlas al proyecto en común.

Y la disponibilidad y/o necesidad de incorporar equipos imprescindibles para la realización de los ensayos.

Los responsables de los centros de investigación, una vez planteado y analizado el estudio o ensayo, decidirán qué proyectos se realizarán en uno u otro centro o si se subcontrataran centros adicionales, las ventajas y desventajas que se observan, qué tipo de normativas se deberán seguir, si son de carácter obligatorio o no y si el personal a su cargo está debidamente entrenado o si necesitan una capacitación específica (AALAS, 2014).

Responsabilidad de los Recursos Humanos

Todas las personas que forman parte del grupo deben saber y conocer lo que tienen que hacer y cuando. Es muy importante contar con el número adecuado de personas necesarias para los ensayos. También se deberá programar un esquema de roles bien definido con tareas, funciones, competencias obligaciones y responsabilidades de cada uno, todo esto debidamente documentado. Aunque al principio parezca engorroso y lleve días su organización, con el tiempo facilitará la tarea y evitará errores. Lo que es más difícil aún, es seleccionar el personal ade-

cuado para cada tarea. Es necesario tener en cuenta no solo la formación científica/técnica, sino también su personalidad y carácter.

Toda empresa o institución tiene períodos variables de actividad, por lo que se deberá disponer de la cantidad de personas suficientes para cumplir con esos períodos de ensayos, para no tener personal sobrecargado de trabajo y otros no productivos. Lo ideal es contar con flexibilidad entre los grupos de trabajo. Capacitando al personal para poder cumplir con las diferentes tareas dentro de su grupo si las circunstancias así lo requieren. Esto puede lograrse a través de cursos internos de formación. Tener la posibilidad de transferir personal entre los grupos sería la situación ideal, aunque sea más difícil.

De no ser posible, el director y los coordinadores deberán tomar la decisión de contratar personas externas especialistas en las técnicas que se requieran o subcontratar el servicio. Los contratos pueden ser fijos o temporales, de acuerdo a la actividad o personal en prácticas, becarios de Universidades enviados a realizar las prácticas o las especializaciones en las empresas. El inconveniente es que muchas veces este personal temporal no cumple con las exigencias establecidas en las normativas establecidas, y por lo tanto no puede realizar los ensayos protocolizados.

Otra estrategia para tener personal con óptimo rendimiento es la motivación, esto ayuda al afianzamiento y unidad del grupo, como también a la continuidad de las personas en los mismos. Si bien el salario es el factor más importante, otros estímulos como el reconocimiento, la flexibilidad horaria y vacacional, participaciones en las reuniones, conocer las decisiones que toman los encargados de grupo y directivos, nuevos escalafones cuando hay posibilidades, asistencia a cursos, congresos y capacitaciones, como la posibilidad de discutir sus pensamientos en distintos niveles.

Los factores negativos perfectamente comprobados que afectan al personal son: exceso de exigencia para cumplir las tareas cuando no se tiene el personal suficiente; el personal sobredimensionado en número induce a una pérdida de tiempo y relajación en las actividades; la falta de información de las decisiones que se toman y la escasa capacitación figuran entre otros (UFAW, 2010).

Del sistema de financiamiento y el éxito

Los objetivos y metas de una empresa, institución, laboratorio o centro incluyen los objetivos y metas financieras, que van a depender no solo de su capacidad interna para definir proyectos, sino del mercado. Siempre se asumirá cierto grado de riesgo financiero cuando se quiere desarrollar un nuevo producto, por los tiempos de investigación y desarrollo, y la obtención de buenos resultados finales. Es por este motivo que muchos centros de investigación, ya sean públicos o privados necesitan subvenciones; del sector estatal o del sector privado, como es el caso de las universidades a las que, sin ellos le sería muy difícil realizar investigaciones de nuevos productos (Zúñiga J., 2017).

Es muy difícil evaluar los recursos que serán necesarios a lo largo de todo el ensayo, ya que son varios los factores que influyen en él, tanto internos como externos y que irán variando en el tiempo de acuerdo con las diferentes situaciones (factores de mercado, costo de materia prima, valores, precio del producto, competencia, etc.)

Se aconseja hacer presupuestos a corto tiempo, anuales; y sin son a largo plazo llevarlos a cabo en 2 etapas, una primera mitad y una segunda donde se llega al producto final, y nunca por períodos mayores de 6 años. Por supuesto que a medida que se va avanzando se irá evaluando la continuidad del proyecto, analizando y haciendo un correcto balance. Lo que puede llevar a tomar decisiones como, por ejemplo, la necesidad de una coparticipación con otras empresas o grupos de trabajo si los costos son muy altos.

Lo ideal son los presupuestos anuales, porque tienen la ventaja de ser más flexibles, se adaptan más a la realidad y se pueden hacer ajustes mensuales.

La dirección es quien tiene la responsabilidad de asignar los recursos disponibles a distintas actividades. Siempre se debe hacer un estudio previo de disponibilidad, posibilidad de pedir recursos, financiamiento, métodos a utilizar, etc. Cada institución o empresa lo hace en forma diferente y como más le conviene, incluso lo pueden variar y cambiar de acuerdo con las circunstancias por las que se atraviese.

Todo esto permitirá un control financiero más estricto en los distintos niveles.

El presupuesto se organizará de acuerdo con las diferentes áreas y las tareas que se realicen en cada una, los proyectos a poner en marcha, etc. Muchas veces es muy importante invertir el tiempo que sea necesario para su realización.

El director o responsable de grupo debe tener en cuenta los gastos fijos (sueldos, alquiler de instalaciones, equipamientos, impuestos, gastos administrativos, mantenimiento de animales, biblioteca, procesamiento de datos, laboratorio y mantenimiento). Otros gastos como el seguimiento de normativas y guías a seguir, que incluyen formación de personal, contratación de personas especializadas si fuera necesario, adecuación de instalaciones, mantenimiento y calibración de aparatos, validación de sistemas, análisis de agua, alimento de animales, puesta en marcha de un sistema de calidad, etc. son valores que aumentan los gastos fijos generales del ensayo.

También muchos ensayos que requieren parte pre-clínica y clínica, no pueden realizarse en el mismo centro, debiendo buscar otros externos, lo que se debe analizar previamente porque incrementa el presupuesto (Bellavista J., 1993).

Posibilidades de financiación

Cuando se analiza un proyecto de investigación se deben conocer muy bien los sistemas de financiación posibles.

Los trabajos de investigación y desarrollo representan un enorme esfuerzo económico, tanto en la industria privada como en la universidad, y muchas veces los resultados que se obtienen

no son satisfactorios, no pudiéndose comercializar el producto. Se sabe que de la gran mayoría de los ensayos que se llevan a cabo son muy pocos los que llegan a comercializar el producto terminado obteniendo beneficios (NCRR, 2000).

Los distintos países cuentan con diversos organismos nacionales que otorgan subsidios a empresas o universidades o a la fusión de entidades público-privadas para realizar un proyecto financiable. En nuestro país, es a través del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, que brinda la más amplia oferta de instrumentos de financiamiento destinados a apoyar proyectos innovativos, emprendimientos tecnológicos, investigación en ciencia y tecnología, formación y repatriación de recursos humanos, y modernización de infraestructura y equipamiento.

Referencias

- AALAS (American Association for Laboratory Animal Science). 2014. Laboratory Animal Facility Compensation Survey. Dublin, OH: Industry Insights, Inc.
- Bellavista J. 1993. Estructura y organización: en Política Científica y tecnología. Evaluación del I+D en la Universitat de Barcelona. Ed. Univ de Barcelona, 331.
- Boisvert, C.M., and P.B. Morgan. 2006. The study support associate: An alternative to the traditional animal care position. *Lab Animal* 35(1):34–38. [PubMed]
- Gentile, F. 2011. Improving efficiency and productivity by implementing a web-based Laboratory Animal Management Systems combined with RFID technology. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 50(5):766–767.
- Jori K. Leszczynski, Jamie Tackett, and Michelle Wallace-Fields. 2017. Management of Animal Care and Use Programs in Research, Education, and Testing. 2nd edition. Chapter 26. Basic Animal Facility Management.
- NCRR (National Center for Research Resources). 2000. Cost analysis and rate setting manual for animal research facilities. https://grants.nih.gov/grants/policy/air/rate_setting_manual_2000.pdf. [PubMed]
- Silverman Jerald. 2017. Management of laboratory animal facility. Third edition. CRC Press
- The Ufaw Handbook on the care and management of laboratory and other research animals. 2010. Eight edition. Willey- Blackwell.
- Zúñiga JM. 1997. Responsable de Investigación. *Formación específica de posgrado en protección y experimentación animal*. SECAL, Granada, España.
- Zúñiga J. Orellana J. y Mari J. 2017. Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal. Gestión de recursos y capital humano en investigación experimental. Universidad de Alcalá. ISBN 10: 8416599939.

CAPÍTULO 25

Gestión de calidad en bioterios

Fabrizio Maschi y Claudia García Bonelli

Historia y evolución del concepto de gestión de calidad

Lo que en la actualidad conocemos como Gestión de Calidad es el conjunto de acciones, medidas y soluciones orientadas a la mejora continua de los procesos internos de una organización, tomando como objetivo principal el aumento del nivel de satisfacción de un grupo de clientes o consumidores, la calidad es el imán que orienta y atrae a las empresas e instituciones que tienen claros sus principios (Ramos Alcázar Gloria María).

El concepto de calidad ha sufrido importantes cambios al largo de las décadas, especialmente desde que se asumió como una necesidad empresarial, veamos cómo ha evolucionado este concepto en el tiempo:

Un poco de Historia en la Aplicación de Normas de Calidad

En diversas actividades, intuitivamente se aplicaban Normas de Calidad, pero en general se estudiaba el producto terminado. Con la llegada de la Revolución Industrial, los primeros sistemas de gestión de calidad empezaron a utilizarse para fijar estándares para el control de productos y resultados; y por lo tanto cuantas más personas trabajaban en un mismo proceso, se necesitó mejorar la práctica precisa para asegurar la calidad de los resultados.

A lo largo de la Segunda Guerra Mundial, el control de calidad se convirtió en un elemento cada vez más importante. Las fuerzas Armadas fueron impulsoras del cumplimiento de protocolos. De esta manera nacen las técnicas de control de calidad, muestreo de inspección y publicación de estándares y pautas de entrenamiento. Era necesario el control de procesos y la simplificación de los mismos sin sacrificar la seguridad.

Durante el siglo XX, la importancia de la calidad siguió avanzando, con grandes impulsos competitivos entre Japón y los Estados Unidos. Fue a finales de ese siglo que nacieron los sistemas de gestión de calidad.

A principios del siglo XXI los Sistemas de Gestión de Calidad (SGC) se nutren de ideas y principios como la sustentabilidad y la responsabilidad social con estos beneficios:

- Alcanzar los requerimientos del cliente, lo que permite crear una confianza en el consumidor e incrementar las ventas repetidas y la recomendación boca a boca.
- Alcanzar los objetivos de la organización, lo que permite cumplir con reglamentaciones en productos y servicios, un manejo eficiente de los recursos, abrir espacios de expansión, crecimiento y ganancias.

En este marco, formarse y conocer los estándares internacionales y otros más específicos a ciertos sectores, es un plus innegable en cualquier organización (Díaz Javier, 2010).

La Argentina cuenta con un Organismo Argentino de Acreditación, el **OAA**. Este organismo es una Entidad Civil sin fines de lucro, creada dentro del marco del Sistema Nacional de Normas, Calidad y Certificación, para desarrollar las funciones establecidas en el Decreto 1474/94.

La acreditación es el reconocimiento formal de competencia e imparcialidad a laboratorios, proveedores de ensayos de aptitud, productores de materiales de referencia, organismos de certificación y/o de inspección (<https://oaa.org.ar>).

Se realiza mediante una evaluación independiente en base a requisitos normativos internacionales. Demuestra que esas entidades son confiables para realizar ensayos, análisis, programas de ensayos de aptitud, producción de materiales de referencia, calibraciones, inspecciones y certificaciones.

Diferentes sistemas de gestión de la calidad (SGC)

Existen distintos sistemas de calidad que una institución, entidad, laboratorio o bioterio podría solicitar para demostrar su competencia. Cada uno evaluará cuál le conviene más, si la solicitud es voluntaria o hay alguna legislación que se lo exija y por ende está obligado a cumplir con alguno en particular.

ISO (Organización Internacional de Normalización)

Es una federación mundial de organismos nacionales de normalización (miembros ISO). El trabajo de elaboración de las normas Internacionales es normalmente llevado a cabo a través de comités técnicos de ISO. Cada miembro interesado en un asunto para el cual se ha establecido un comité técnico tiene el derecho a ser representado en ese comité. Las organizaciones internacionales, gubernamentales y no gubernamentales, en alianza con ISO, también participan en el trabajo. En el campo de la evaluación de la conformidad, ISO y la Comisión Electro-

técnica Internacional (IEC) desarrollan documentos conjuntos ISO/IEC bajo la gestión del Comité de ISO para la Evaluación del Conformidad (ISO/CASCO).

ISO 9001 – 2015

Conduce a la institución u organización a enfocarse en el cumplimiento de las necesidades y expectativas de sus clientes poniendo en práctica los requisitos regulatorios aplicables y el continuo control y mejoramiento de su producto o servicio.

Emplea un enfoque orientado a procesos, que incorpora el ciclo: planificar-hacer-verificar-actuar, y el pensamiento basado en riesgos. El enfoque a procesos permite a una organización planificar sus procesos e interacciones. El pensamiento basado en riesgos posibilita determinar los factores que podrían causar que sus propios procesos y sistema de gestión de calidad se desvíen de los resultados planificados, para poner en marcha controles preventivos de manera de minimizar los efectos negativos y maximizar el uso de las oportunidades a medida que surjan (<https://www.normas-iso.com/iso-9001/>).

ISO/IEC 17025

Esta es otra norma que involucra a conformar un sistema de calidad y apunta a los requisitos generales que deben reunir para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.

Este documento se ha desarrollado con el objetivo de promover la confianza en la operación de los laboratorios. Contiene requisitos que hacen posible que los laboratorios demuestren que operan de forma competente y que tienen la capacidad de generar resultados válidos. Los laboratorios que cumplen con este documento también operarán en general de acuerdo con los principios de la Norma ISO 9001.

Este documento requiere que el laboratorio planifique e implemente acciones para abordar los riesgos y las oportunidades. Al abordar los riesgos y las oportunidades se establece una base para incrementar la eficacia del sistema de gestión, lograr mejores resultados y prevenir efectos negativos. El laboratorio es responsable de decidir qué riesgos y oportunidades es necesario abordar.

El uso de este documento facilitará la cooperación entre los laboratorios y otros organismos, y ayudará al intercambio de información y experiencia, así como también a la armonización de normas y procedimientos. La aceptación de resultados entre países se facilita si los laboratorios cumplen con el presente documento (<https://www.iec-iso-17025.com/>).

Una vez implementado el SGC basado en la Norma 17025, incluyendo la Revisión por la Dirección y al menos una Auditoría Interna satisfactoria, el laboratorio acredita el ensayo ante el Organismo Argentino de Acreditación, OAA (<https://oaa.org.ar>).

AAALAC International - Asociación Internacional para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International)

AAALAC International es una organización privada, no gubernamental, de solicitud voluntaria que promueve el trato humanitario de los animales en las actividades científicas mediante programas voluntarios de evaluación y acreditación.

Cientos de compañías farmacéuticas y biotecnológicas, universidades, hospitales y otras instituciones de investigación de todo el mundo han obtenido la acreditación de AAALAC, lo que prueba su compromiso con el cuidado y uso responsable de los animales. Estas instituciones buscan alcanzar y mantener la acreditación de AAALAC International, y cumplir de este modo no solo con las normas locales, nacionales e internacionales que regulan las investigaciones con animales, sino también con los estándares aceptados a nivel internacional de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) publicada por el Consejo Nacional de Investigación (National Research Council) de los Estados Unidos en el año 2010.

Beneficios de la acreditación por AAALAC International

Reconocida internacionalmente como símbolo de calidad en ciencia.

Facilita la colaboración con otras instituciones que demandan los mismos estándares de bienestar animal y calidad científica.

Facilita la financiación de algunas entidades ejemplo: National Institute of Health (NIH). Armoniza criterios en el ámbito internacional. - Tiene un proceso de autoevaluación inicial, que desafía a los procedimientos antiguos y obsoletos. - Mejora continua, gracias a las evaluaciones periódicas, cada 3 años.

Promueve el trabajo en equipo entre los distintos grupos de la institución involucrados en el proceso.

Sirve para el reclutamiento de personal de alto nivel

Demuestra responsabilidad ante la sociedad con respecto al cuidado de los animales.

Reconoce el trabajo de algunos trabajos básicos en el bioterio (cuidadores, etc) (<https://www.aaalac.org>).

BPL - Buenas Prácticas de Laboratorio (OCDE):

Las Buenas Prácticas de Laboratorio son un sistema de garantía de calidad relativo al modo de organización de los estudios de seguridad no clínicos referentes a la salud y al medio ambiente y, asimismo, acerca de las condiciones en que estos estudios se planifican, ejecutan, controlan, registran, archivan e informan. Se aplican a todos los estudios no clínicos de seguridad.

dad sanitaria y medioambiental requeridos por los reguladores con el fin de registrar o autorizar productos: Farmacéuticos, Pesticidas químicos, Pesticidas Biológicos, organismos genéticamente modificados (OGM), Aditivos, Productos cosméticos, Medicamentos veterinarios y Productos químicos industriales.

La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, OCDE, ha establecido un acuerdo de Aceptación Mutua de Datos para la Evaluación de Químicos, (MAD) que tiene por objeto evitar la repetición en los países de destino, de los estudios/ensayos que respaldan el registro de productos, eliminando de este modo las barreras técnicas al comercio, reduciendo el número de ensayos con animales, los costos y tiempos. Este acuerdo surgió, como mecanismo de reconocimiento entre los países miembros estableciendo que, los estudios desarrollados bajo los principios de BPL en entidades de ensayos inspeccionadas por una Autoridad de Monitoreo reconocida por la OCDE, deben ser aceptados en todos los países miembros. Más tarde, se abrieron las puertas del MAD a los países no miembros a través de un proceso de adhesión, primero provisional hasta alcanzar la adhesión plena, que cuenta con los mismos derechos y obligaciones que los países miembros.

Argentina, es adherente pleno al acuerdo de Aceptación Mutua de Datos para la Evaluación de Químicos (MAD) de la OCDE pues posee un Programa Nacional de Monitoreo de la Conformidad con las BPL para productos Pesticidas, Biocidas y Químicos industriales establecido por el OAA, Autoridad Nacional de Monitoreo, que ha sido reconocido por la OCDE. La adhesión plena, permite a las entidades de ensayo inspeccionadas por el OAA y declaradas en conformidad con las BPL, que los datos generados por éstas sean aceptados por los países miembros y adherentes plenos, y de este modo, minimizar las barreras no tarifarias al comercio.

El Programa de Monitoreo de la Conformidad con las BPL es aplicable únicamente a instalaciones que realizan estudios no clínicos de salud y seguridad ambiental. Estos estudios se llevan a cabo para obtener datos sobre las propiedades y/o la seguridad de un elemento de ensayo que puede estar contenido en productos farmacéuticos, pesticidas, cosméticos, drogas veterinarias, así como en aditivos alimenticios, aditivos en alimentos para animales y productos químicos industriales. Los datos obtenidos de los estudios tienen por objetivo ser presentados a las autoridades reguladoras, ya sea de Argentina o del extranjero, para el registro o la autorización de productos químicos para su uso.

Promueve la calidad y validez de los resultados de los ensayos que se emplean para determinar la inocuidad de químicos y sus productos.

Se ocupa del proceso organizacional y de las condiciones bajo las cuales se planifican, realizan, controlan e informan los estudios y pruebas de laboratorio.

Brinda confiabilidad sobre integridad y calidad de los resultados garantizando la trazabilidad de los mismos (OECD - 2001).

Independientemente de que sistema de gestión de calidad elija la organización o institución a aplicar deberá tener un sistema documental que generalmente está compuesto por:

Documentos de un SGC



¿Cómo se Asegura la Calidad? Los puntos más importantes con los que se debe contar son:

- Calibración y verificación de los equipos.
- Validación o verificación de los métodos de ensayo.
- Cartas o planillas de control interno.
- Contar con materiales de referencia.
- Participación en programas de competencia externa, ensayos de aptitud o Inter laboratorios.
- Planificación de auditorías Internas.
- Contar con criterios de admisibilidad y rechazo de muestras

¿Cómo se Logra la Competencia Técnica?

- Personal calificado y entrenado.
- Métodos normalizados o validados.
- Instrumental calibrado y trazable a las unidades del Sistema Internacional (SI)

Buenas prácticas de documentación

Todos los procedimientos estandarizados de trabajo (POES) e instructivos técnicos deben reunir las siguientes características:

- Deben ser completos.
- Exactos.
- Legibles.
- Escritos en la lengua del país donde se utilizan.
- Empleando un vocabulario sencillo y adecuado de acuerdo con el nivel y jerarquía del documento.
- Estar organizados de tal manera que sean de fácil comprensión y lectura.
- Deben estar firmados y fechados por las personas que participaron en el proceso.
- Deben estar paginados y foliados con el logo de la empresa.

- En caso de solicitarlo, deben ser revisados o verificados por segundas personas.
- Deben completarse con tinta permanente, no se debe utilizar lápiz ni tinta borrrable.

Recordar que “Si no está escrito, no ha sucedido” y que “si no está escrito CORRECTAMENTE, entonces tampoco ha sucedido”

Por lo antedicho, es fundamental entender que para cualquier Bioterio que aspire a aplicar a un SGC, es imprescindible comenzar a documentar todas sus actividades en

Procedimientos estandarizados de trabajo POEs.

Estos contendrán mínimamente:

1. Objetivo del procedimiento.
2. Responsabilidad de aplicación y alcance.
3. Definiciones.
4. Descripción del procedimiento.
 - 4.1. Distribución del POE.
 - 4.2. Revisión y control de cambios
5. Registros que genera el POE.
6. Anexos (tablas, planillas, etc)

Y es imperativo para casi cualquier SGC la necesidad de implementar un lugar de Archivo de toda la documentación, POEs, instructivos, planillas, muestras y contra muestras, material de referencia, planes de estudio e informes que se generen en la Institución, la cual deberá almacenarse por un límite dado de tiempo (Sabater – Tobella J., 1993).

La implementación de un sistema de gestión de calidad, es finalmente, hacer más confiable y transparente a la institución, aceptando mutuamente resultados generados entre distintos países, evitar la duplicación innecesaria de ensayos y evitar y/o reducir el número de animales utilizados o reemplazarlos en caso que sea posible por métodos alternativos, para la aclaración de distintos fenómenos contribuyendo de esta manera con las 3rs, ahorrando tiempo, dinero y contribuyendo con el bienestar animal (Carson PA., 1990).

Referencias

Carson PA, Dent NJ. 1990. Good Laboratory and Clinical practices. Heinemann Professional Publishing Ltd. Oxford.

Díaz Javier, 2010 recuperado de <https://www.emprendices.co/calidad-total-origen-evolucion-y-conceptos/>

Garfield FM. 1993. Principios de Garantía de Calidad para Laboratorios Analíticos. Edición Española. AOAC.

Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Eight edition, NRC, The National Academies, USA, 2010

<https://www.aaalac.org>

<https://www.iec-iso-17025.com/>

<https://www.normas-iso.com/iso-9001/>

<https://oaa.org.ar>

<https://www.oecd.org>

OECD series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monography - 2001.

Ramos Alcázar Gloria María, recuperado de <https://www.sutori.com/story/historia-y-evolucion-del-concepto-de-gestion-de-calidad--VMb6P4wrEX1F3M7fgKtHtjRr>

Sabater – Tobella J. 1993. Implementation of GLP in the analytical service laboratory. Chapter 4: implementing International Good Practices: GAPs, GLPs, GMPs. Ed. Dent NJ Interpharms Press

Los autores

Coordinadores

Carbone, Cecilia

Medica Veterinaria recibida en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP). Profesora invitada en el curso de Introducción a la Ciencia de los Animales de Laboratorio, FCV UNLP miembro del Consejo Asesor del Sistema Nacional de Bioterios MinCyT miembro de la Comisión de Bienestar Animal FCV UNLP Asesora en ética y bienestar animal de la plataforma Estudios Biológicos con Animales de Laboratorio Directora del Laboratorio de Animales de Experimentación LAE FCV UNLP hasta el año 2018 Publicaciones relevantes en revistas científicas: Non-aversive photographic measurement method for subcutaneous tumours in nude mice. *Laboratory Animals*. 2019. Effect of Simple and Complex Enrichment Added to Standard-Sized Cages in Behavioral, Physiological, and Neurological Variables in Female Swiss Mice (*Mus Musculus*). *Behavioral Neuroscience*. 2020.

Ayala, Miguel Ángel

Doctor en Ciencias Veterinarias, Bacteriólogo Clínico e Industrial y Médico Veterinario egresado de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP). Director del LAE FCV UNLP. Profesor Titular. Cursos Microbiología I e Introducción a la Ciencia de los Animales de laboratorio en la carrera de Ciencias Veterinarias y Animales de Laboratorio de la carrera de Microbiología Clínica e Industrial de la FCV-UNLP. Microbiological contaminations of laboratory mice and rats in conventional facilities in Argentina *Revista Argentina de Microbiología*. In vitro and in vivo anticancer effects of two quinoline–platinum(ii) complexes on human osteosarcoma models. *Cáncer Chemotherapy and Pharmacology*. Director Estudio de los factores que influyen en el bienestar de ratas y ratones de experimentación durante los procedimientos experimentales Parte 1 .

Cagliada, María del Pilar

Médica Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. (FCV-UNLP). Bacterióloga Clínica e industrial. FCV-UNLP. Profesora Adjunta del Laboratorio de Animales de Experimentación (LAE). Docente en los cursos: “Animales de Laboratorio”. Carrera

Microbiología Clínica e Industrial. “Acción Patógena Experimental” 1ºAño-Microbiología I y en Introducción a la Ciencia de los Animales de Laboratorio. 5ºAño. Carrera de Cs Veterinarias. Y “Animales de Laboratorio”. 3ºAño. En la Carrera de Microbiología Clínica e Industrial. FCV-UNLP. Responsable del laboratorio del LAE y servicios externos de Controles Sanitarios de colonias de animales de experimentación. Publicaciones relevantes: Libro Microbiología Veterinaria. Capítulo: Acción Patógena Experimental 2ª Edición. Año: 2007 y Libro Temas de Zoonosis IV. Capítulo: Zoonosis en ratas, ratones y Conejos de experimentación. 1ª Edición. Año: 2008.

Autores

Antonini, Alicia Graciela

Doctora en Ciencias Veterinarias. Médico Veterinario. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (FCV, UNLP) Profesora Asociada a cargo de la Cátedra de Genética de Poblaciones y Mejoramiento Animal, FCV, UNLP. Directora de Proyectos de Investigación I+D, Producción Animal y Mejoramiento Genético en cabras y conejos. Directora de Proyectos de Extensión. Producción Pecuaria para autoconsumo. Algunos artículos publicados en International Journal of Science.: Alkhaer Publications.2018 ISSN 2305-3925, V. 7, Evaluation of Feather Meal in the Diet of Growing Rabbit; Analysis of Morphofaneroptic Markers of Caprine Population of National University of La Plata; y en Analecta Veterinaria FCV UNLP. 2018 vol.38 n°. p23 – 32. Estudio del comportamiento porcino: una mirada etológica sobre la producción porcina.

Carranza Martin, Ana Cristina

Doctora en Ciencias Veterinaria otorgado por Facultad de Ciencias Veterinarias de La universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP). Médica Veterinaria recibida en la Universidad Católica de Córdoba (UCC). Ayudante diplomado simple en la materia Introducción a la Ciencia de los Animales de Laboratorio en la FCV-UNLP. Investigadora asistente de CONICET en el Instituto de Genética Veterinaria FCV-UNLP. Publicaciones relevantes en revistas internacionales: Histologic effect of a postnatal slow- release GnRH agonist on feline gonads. Theriogenology, 2015; Non-aversive photographic measurement method for subcutaneous tumours in nude mice. Laboratory Animals. 2018; Ghrelin antagonist overrides the mRN expression of NPY in hypothalamus in feed restricted ewes. Plos One. 2020. Proyectos de investigación en biotecnologías reproductivas en rumiantes.

Carriquiriborde, Martín

Licenciado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata (FCNyM, UNLP). Animales de Laboratorio e Introducción a la Ciencia de los Animales de Laboratorio, Jefe de Trabajos Prácticos, Fac. de Cs. Veterinarias, UNLP. Microbio-

logical contaminations of laboratory mice and rats in conventional facilities in Argentina. *Rev Argent Microbiol.* <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.05.003>. 2020. Potential therapeutic targets for growth arrest of colorectal cancer cells exposed to PTHrP. *Molecular and Cellular Endocrinology* <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.07.005>. 2018. Patogenicidad microbiana en Medicina Veterinaria. Volumen: Bacteriología. Capítulo Mecanismos de patogenicidad bacterianos. 2018. Categoría docente-investigador IV, animales de laboratorio, FCV-UNLP.

García Bonelli, Claudia Cristina

Bioquímica y Licenciada en Análisis Clínicos recibida en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (FFyB - UBA). Profesional Principal CONICET en el Instituto de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Responsable de Calidad de la Plataforma Tecnológica EBAL. Desde marzo de 2020 Coordinadora de Policía Científica del Ministerio de Seguridad de la Nación. Experta Técnica del Organismo Argentino de Acreditación en Laboratorios de Análisis Médicos en la especialidad HPLC en productos farmacéuticos y en Laboratorios de Ensayos en la especialidad HPLC para muestras biológicas de drogas y neuroquímicos. Estudios de Bioequivalencia. Integrante del Consejo Asesor del Programa Nacional Ciencia y Justicia de CONICET.

Laborde, Juan Martín

Doctor en Ciencias Veterinaria otorgado por la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad Nacional de La Plata. Licenciado en Biología otorgado por la Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Master Universitario en Biología Molecular y Biomedicina otorgado por la Universidad del País Vasco, España. Especialización en Diagnóstico Veterinario de Laboratorio (FCV-UNLP). Jefe de trabajos prácticos Dedicación Exclusiva en los cursos Animales de Laboratorio; (CMCI), Microbiología I, 1º Año; Introducción a la Ciencia de los Animales de Laboratorio 5º Año (FCV). Microbiological contaminations of laboratory mice and rats in conventional facilities in Argentina (2019); Indirect ELISA for routine detection of antibodies against Minute Virus of Mice (MVM) in mice colonies (2017). *Revista Argentina de Microbiología*. Docente Investigador Categoría IV Interferencia de patógenos en ensayos con modelos animales (FCV-UNLP).

Maschi, Fabricio Alejandro

Biólogo y Doctor en Ciencias Veterinarias recibido en la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad Nacional de La Plata (FCNyM-UNLP). Manager del Bioterio de producción de roedores SPF del Laboratorio de Animales de Experimentación LAE- FCV UNLP. Director de la Comisión de Cuidado y Uso de Animales en Experimentación (CI-CUAL) de la FCV - UNLP. Profesor adjunto exclusivo de la materia Introducción a la Ciencia de los Animales de Laboratorio en la FCV-UNLP. Inspector de Buenas Prácticas de Laboratorio BPL OCDE para el Organismo Argentino de Acreditación OAA. Director del

Nodo FCV UNLP - EBAL – PPL II 008 de la ANPCyT - FONCyT. Publicaciones relevantes en revistas internacionales: “De reactivo biológico al animal sintiente: el bienestar animal como cambio de paradigma en la investigación biomédica y su impacto en los resultados”. *Analecta Veterinaria* 39 (1) 21- 31. Junio de 2019.

Milocco, Silvana

Médica Veterinaria recibida en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP). Realizó la Especialidad en Ambiente y Patología Ambiental dictada por la UNLP y la Universidad de los Estudios de Siena (Italia). Master in Sciences with major in Veterinary Medicine (SLU, Suecia). Jefa de Trabajos Prácticos en la materia Introducción a la Ciencia de los Animales de Laboratorio en la FCV-UNLP. Editora del libro “Ciencia y tecnología en experimentación y protección animal” McGraw Hills, 2001. Tiene varias publicaciones en revistas científicas y presentaciones de trabajos en congresos relacionados con la Ciencia de Animales de Experimentación.

Principi, Guido

Médico Veterinario y Especialista en Sanidad y Producción Porcina (FCV UNLP), recibido en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP). Ayudante diplomado semi dedicación en la cátedra de Producción Porcina y docente colaborador en la materia Introducción a la Ciencia de los Animales de Laboratorio en la FCV-UNLP. Publicaciones relevantes: Caracterización sanitaria y socio productiva de la producción porcina del sector de la Agricultura Familiar de la provincia de Buenos Aires SEDICI UNLP. Milocco S. Principi GM, et al 2019. Integrante del proyecto de investigación sobre Evaluación del crecimiento de las líneas celulares humanas MDA-MB-231 (glándula mamaria) y HT-29 (adenocarcinoma de colon) en ratones NLAE:NIH(S) Fox1nu.

Resasco, Agustina

Médica Veterinaria y Doctora en Ciencias Veterinarias recibida en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP). Realizó la Especialidad en Bienestar Animal dictada por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires. Ayudante diplomada simple en la materia Introducción a la Ciencia de los Animales de Laboratorio en la FCV-UNLP. Becaria Postdoctoral de CONICET en el Instituto de Biología Celular y Neurociencias “Prof. E. De Robertis” (CONICET-UBA). Publicaciones relevantes en revistas internacionales: Effect of Simple and Complex Enrichment Added to Standard-Sized Cages in Behavioral, Physiological, and Neurological Variables in Female Swiss Mice (*Mus Musculus*). *Behavioral Neuroscience*. In press; Non-aversive photographic measurement method for subcutaneous tumours in nude mice. *Laboratory Animals*. 2019.

Rogers, Estela Cora

Lic. en Biología, Zoóloga la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad Nacional de La Plata. Becaria de capacitación laboral en el Laboratorio de Animales de Experimentación de la Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP desde 2017 hasta la actualidad. Nodocente. Técnico especializado en Animales de Laboratorio desde 1992. Responsable y supervisora de la producción de las colonias de distintas cepas ratas y ratones SPF del bioterio del LAE FCV UNLP. Mantenimiento y producción de colonias endo y exocriadas de roedores de laboratorio. Recepción de los pedidos, confección de presupuestos y organización de envíos. Diagramar la producción de acuerdo a los pedidos de animales recibidos. Entrenamiento de personal nuevo que comienza a trabajar en el área de producción.

Vercellini, María Clara

Se recibió como Médica Veterinaria en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Ayudante diplomada simple en la materia Introducción a la Ciencia de los Animales de Laboratorio en la FCV-UNLP. Se desempeña como profesional de apoyo en el Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE- CONICET). Participa como miembro de CICUAL de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP desde 2015. Actualmente, realiza su tesis doctoral en el Laboratorio de Parásitos y Patógenos de Peces, Moluscos y Crustáceos del CEPAVE.

Ciencia y bienestar de los animales de laboratorio / Silvana Milloco... [et al.] ; coordinación general de Cecilia Carbone ;

Miguel Ayala ; María del Pilar Cagliada.- 1a ed.- La Plata : Universidad Nacional de La Plata ; EDULP, 2021.

Libro digital, PDF - (Libros de cátedra)

Archivo Digital: descarga
ISBN 978-950-34-2076-8

1. Animales. 2. Animales de Laboratorio. I. Milloco, Silvana. II. Carbone, Cecilia, coord. III. Ayala, Miguel, coord. IV. Cagliada, María del Pilar, coord.
CDD 590.724

Diseño de tapa: Dirección de Comunicación Visual de la UNLP

Universidad Nacional de La Plata – Editorial de la Universidad de La Plata
48 N.º 551-599 / La Plata B1900AMX / Buenos Aires, Argentina
+54 221 644 7150
edulp.editorial@gmail.com
www.editorial.unlp.edu.ar

Edulp integra la Red de Editoriales Universitarias Nacionales (REUN)

Primera edición, 2021
ISBN 978-950-34-2076-8
© 2021 - Edulp

n
naturales


Edulp
EDITORIAL DE LA UNLP



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA