



Encarnación, 16 de noviembre de 2020

## RESOLUCIÓN CONSEJO DIRECTIVO FM/UNI - N° 120/2020

### VISTA:

La sesión de fecha 05 de noviembre de 2020 del Consejo Directivo de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Itapúa, y. -----

### CONSIDERANDO:

Que, en la misma se ha incluido en el orden del día “*Documentos recibidos y remitidos*”, dándose tratamiento a la nota presentada por la Bioq. Analia Paniagua, Encargada del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Itapúa.-----

Que, mediante la nota de referencia presenta el manual de procedimiento del Bioterio.-----

Que, habiendo analizado el documento presentado y el dictamen de Asesoría Jurídica en referencia al documento presentado.-----

### POR TANTO

**EL CONSEJO DIRECTIVO DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ITAPÚA, EN USO DE SUS ATRIBUCIONES Y DEBERES,**

### RESUELVE:

**1. APROBAR**, Manual de Procedimiento del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Itapúa, acorde al anexo que forma parte de la presente resolución.-----

**2. COMUNICAR** a quienes corresponda y cumplido archivar.-----



*Abg. Anita Gysin Romaniuk*  
Secretaria General



*Dr. Claudio Díaz de Vivar*  
Decano



# UNIVERSIDAD NACIONAL DE ITAPÚA (UNI)

Creada por Ley 1009/96 de fecha 03 de Diciembre de 1996

## *FACULTAD DE MEDICINA*

### *Manual de Cuidados y Procedimientos*

### *en el Laboratorio de Bioterio*

## Capítulo I

### Fundamentos y Consideraciones Generales sobre el Laboratorio de Bioterio

#### 1. Creación del Bioterio de la facultad de Medicina

En el marco del proyecto “Establecimiento de la toxicidad aguda, el efecto analgésico, antiinflamatorio y antibacteriano del extracto hidra-alcohólico de *Begonia cucullata* Willd. var. *cucullata* (Begoniaceae) (agrícola) en ratones. Llevado a cabo en convenio con Universidad Nacional de Misiones, Facultad de Ciencia Exactas, Químicas y Naturales para Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología – CONACYT. Dicho proyecto se desarrolló siendo la responsable técnica la Prof. Dra. María del Carmen Helliòn, capacitadoras científicas las: Prof. Dra. Yenny Montalbetti y Prof. Dra. Olga Heinichen. En donde la construcción del Bioterio da inicio o forma parte de la contrapartida Institucional en el Proyecto financiado por el CONACYT.

La Facultad de Medicina de la UNI por ser una institución universitaria pública que realiza docencia, investigación y extensión en las ciencias médicas y biomédicas aplicadas en el ámbito de la salud. Responde a demandas de la sociedad, respetando los valores éticos y vinculando permanentemente la calidad y el desarrollo de sus recursos humanos como medio para posicionar a la Facultad de Medicina como institución de referencia en la formación de Recursos Humanos capacitados, la generación de conocimientos mediante la investigación científica (básica y aplicada) y la provisión de servicios propios a las ciencias médicas y sus aplicaciones en el ámbito de la salud pública y el medio ambiente y siempre respondiendo a todas estas necesidades una vez se pone a la altura de las necesidades de los tiempos actuales y pone en marcha el primer Bioterio del interior del país.

#### 2. Descripción de las instalaciones del Bioterio

Las instalaciones de Bioterio se dividen en tres áreas distintas: producción; higiene y esterilización; y experimentación (Figura 1).

Sala 1 y 2: De experimentación

Sala 3 y 4: De producción

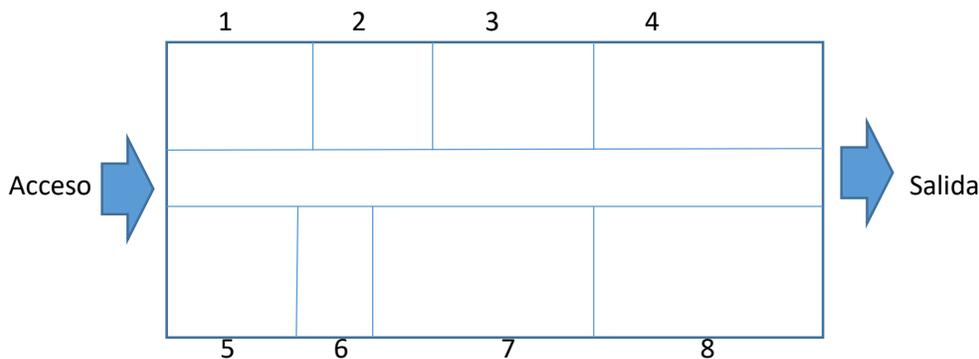
Sala 5: Oficina Administrativa

Sala 6: Zona de guardado estéril

Sala 7: Sala de pesada

Sala 8: Sala de higiene y esterilización

Figura 1. Descripción general



### 2.1 Diseño de un Bioterio

Un elemento importante para el cuidado y uso de animales, son las instalaciones diseñadas construidas y mantenidas apropiadamente, además, que faciliten una operación segura, eficiente y económica.

Bioterio convencional o de corredor único: el tránsito es mediante una única puerta, la cual comunica hacia un corredor común de acceso y salida.

Bioterio con dos corredores de acceso: en donde se separan el acceso y retorno de la sala, los cuales se efectúan por corredores independientes, diseñado para albergar animales de mayor calidad. Se separan dos áreas básicas, una destinada a la preparación del material y el otro es el corredor de retorno destinada a la limpieza de materiales.

Sección de experimentación

Sección de producción

Sección de Higiene y Esterilización.

### 2.2 Barreras sanitarias

Sistema que combina instalaciones físicas, equipamiento y procedimientos operacionales, que separan una zona limpia de una zona sucia o de un lugar menos limpio de otra más limpia, minimizando la probabilidad de que organismos patógenos se pongan en contacto con la población animal del Bioterio.

Ejemplo de barreras sanitarias:

- Instalaciones físicas: esclusas, vestidores, con presión diferencial de aire, renovación de aire/hora, filtración y tratamiento de agua.
- Equipamiento: implementos de protección personal, como vestimenta, mascarilla, gorro y guantes. Uso de pediluvios con desinfectante de una sala a otra sala, barreras anti roedores y anti insectos.

Procedimientos operacionales; de ingreso de personal, de materiales, de limpieza y desinfección de ambientes y de materiales

### 3. Organización para evaluación los proyectos de Investigación a ser realizados en el Bioterio.

Para la presentación de los proyectos de investigación los interesados deberán presentar sus propuestas al;

1. Comité de Ética de la Facultad de Medicina.
2. A los encargados del Bioterio y la Cátedra de Farmacología.

Si estos son aprobados por todas las unidades, se remiten al Bioterio, donde reciben un número de control y se archivan. A través de la información contenida en los protocolos, el equipo de Bioterio controla la salida de animales para los investigadores, obedeciendo los criterios de cantidad de animales, especie, linaje y sexo.

Al iniciar el experimento en el Bioterio, el investigador y / o alumno responsable del experimento recibe las reglas internas de bioseguridad y un protocolo que debe ser completado, con preguntas específicas sobre el experimento a realizar.

Luego, continuaran con la capacitación sobre la vestimenta correcta, flujo de entrada y salida del Bioterio, conocimiento de las áreas comunes y la sala donde se realizará el experimento.

### 4. Ética en la experimentación animal

La experimentación animal se hizo más frecuente en Europa, entre los siglos XVI y XVIII. En ese momento, los científicos se basaban en opiniones como la del filósofo francés René Descartes (1590-1650) y sus ideas sobre el mecanismo. Para el filósofo, los animales no tenían la capacidad de sentir dolor y eran considerados solo máquinas complejas. El avance de la tecnología y esta nueva ciencia, denominada "Ciencia en animales de laboratorio", ha ido cambiando los paradigmas y comportamientos de los investigadores y profesionales que utilizan animales en la investigación. Actualmente, somos plenamente conscientes de que la sensibilidad del animal es similar a la del humano en cuanto al dolor, la memoria, la angustia y el instinto de supervivencia (art. 2 - Principios éticos en la experimentación animal en SBCAL), que debe ser utilizado por todos. Los posibles medios para minimizar el dolor y el sufrimiento del animal. Los experimentos deben realizarse de manera ética y justificada, no abusando del derecho humano sobre los animales y evitando su sufrimiento.

Los investigadores que trabajen y experimenten con animales están moralmente obligados a manifestarles tres tipos de actitudes:

**Respeto:** por tratarse de seres vivos y sensibles, que están experimentando sufrimiento podrían terminar perdiendo la vida, tratárseles con todas las consideraciones que el caso merece.

**Afecto:** considerándolos partícipes con nosotros, del misterio de la vida.

**Gratitud:** reconocimiento por la importante ayuda al constituirse nuestros más íntimos colaboradores.

#### 4.1 Principio de las 3 R

En 1959, el zoólogo William MS Russell y el microbiólogo Rex L. Burch publicaron el libro *The Principles of Humane Experimental Technique*, en el que establecieron el principio de las 3 R, que trajo avances en la investigación animal y estableció un hito importante para la Ciencia en animales de laboratorio. Los autores pudieron sintetizar el principio humanitario de la experimentación animal en tres palabras importantes, que deben seguirse al preparar proyectos de investigación animal. Las tres palabras se originan en inglés y comienzan con "R", por lo que ahora se denominan el principio de las 3 R: Reemplazar, Reducir y Refinar.

En su propuesta, Russel y Burch sugieren reemplazar el uso de animales por modelos alternativos no sensibles, reducir el número de animales por experimento y perfeccionar las técnicas y procedimientos que se realizarán en los animales.

##### Principio de las 3 R

**Reemplazar:** consiste en reemplazar el uso de animales con modelos alternativos no sensibles, siempre que sea posible, o con animales con un sistema nervioso menos desarrollado. Algunos ejemplos de métodos de sustitución para uso animal son: modelos computacionales y matemáticos, ensayos in vitro, cultivo celular, modelos y simuladores mecánicos, películas y videos interactivos para demostración en clases

**Reducir:** consiste en reducir el número de animales por experimento, sin perjudicar la calidad del resultado experimental. Esto se puede lograr, por ejemplo, con cálculos de muestra bien definidos y con la elección del mejor modelo biológico a utilizar. Para el tratamiento estadístico, se pueden considerar pruebas piloto, que a menudo definen con mayor precisión el número de animales a utilizar. La elección del modelo apropiado para el experimento implicará una reducción en el número de animales y una mejor calidad del resultado final.

**Refinar:** Los científicos proponen que las técnicas y procedimientos que se realizarán en los animales sean menos invasivas y lo más refinadas posible, pudiendo reducir el dolor, la angustia y el sufrimiento animal. Este refinamiento cubre protocolos experimentales bien definidos de anestesia, analgesia, así como el uso, cuando sea necesario, de antiinflamatorios y antibióticos, antes y después de la cirugía, así como métodos de extracción de sangre e inmunización. Lo menos invasivo posible, donde algunos métodos requieren el uso de técnicas anestésicas y entrenamiento.

El entrenamiento del equipo involucrado en el experimento es de suma importancia. Todos deben tener conocimiento de las técnicas y procedimientos que se realizarán en los animales, así como de los métodos de manejo y contención. Este entrenamiento proporcionará al investigador la introducción de métodos de socorro, si el animal lo necesita, y una descripción más precisa en el seguimiento de los animales.

##### 5. Entrenamiento

La formación del personal involucrado en la experimentación animal garantiza el desarrollo de un trabajo ético y de mejor calidad. El manejo correcto de los animales y una buena sujeción se reflejan en la reducción del estrés del animal y en un buen avance del experimento. Se requieren

la formación de los estudiantes en los procedimientos y técnicas que se realizarán en los animales. El Bioterio realizara cronogramas de capacitación para los estudiantes, clases teóricas y prácticas sobre los procedimientos con animales. Para la clase práctica con los alumnos, se agentara cita previa en el Bioterio, que presentara un cronograma de fechas disponibles.

Estos entrenamientos incluyen técnicas de manejo y contención y técnicas específicas según los procedimientos requeridos en cada tipo de experimento. Es común que el alumno muestre cierto miedo al manipular a los animales, pero este se minimiza durante el entrenamiento.

El personal debe estar capacitado en:

- Identificar las principales enfermedades zoonóticas que afectan a los animales de laboratorio.
- Manejo de animales de laboratorio, según las buenas prácticas de crianza.
- Peligros microbiológicos y físicos (incluyendo aquellos relacionados con la radiación y las alergias).
- Limpieza y esterilización de ambientes y materiales.
- Higiene personal.
- Salud y seguridad ocupacional.
- Manejo de materiales de desecho.
- Seguridad química e industrial.
- Manejo de equipos utilizados en la producción: autoclaves, hornos, caldero, ablandador de agua, cabinas de seguridad biológica y otros.

Deberán implementarse programas de capacitación continua.

## 6. Características generales y comportamiento

Un concepto importante del bienestar animal es la homeostasis, que significa que el animal está en armonía con su entorno.

La homeostasis requiere que el animal se adapte y controle en diferentes situaciones. Cuando no se puede mantener la homeostasis, pueden producirse molestias o estrés, con posible manifestación de enfermedad o comportamiento anormal, como estereotipos.

Los estereotipos son comportamientos de patrones simples repetidos, como movimientos en círculos o saltos constantes en la jaula, que parecen no tener sentido y son típicos de los animales alojados en aislamiento.

Es deber del ser humano promover el bienestar de los animales, en el que, juntos, contribuirán al bienestar de todos. El bienestar de los animales debe garantizarse tanto en la producción como en la experimentación, manteniendo bajo control el alojamiento y las condiciones ambientales.

La manipulación y el transporte cuidadoso, así como el conocimiento de la importancia, necesidades y comportamientos normales de las especies utilizadas como animales de laboratorio, son también factores esenciales para evitar el estrés y posibilitar la promoción del bienestar animal, obteniendo, por tanto, datos fiables e investigación satisfactoria.

### 6.1 Comportamiento de ratas y ratones

Las ratas y ratones de laboratorio siempre muestran similitudes con la reproducción en la naturaleza. En la naturaleza, las ratas excavan y construyen túneles para dormir durante el día despejado. Prefieren vivir en escondites (túneles) ubicados cerca del agua. Los túneles terminan en un compartimento que se utiliza para anidar y almacenar alimentos. Son animales sociables y

desarrollan una jerarquía entre grupos. El ratón es un mamífero de sangre caliente, de hábitos nocturnos y su comportamiento está influenciado por feromonas. Posee un agudo sentido de la audición, por lo que se alteran rápidamente con los ruidos, es por ello que hay que tener cuidado con los equipos que se utilizan.

Su sentido del olfato está muy desarrollado, no sólo para detectar comida y depredadores, sino también para percibir un orden social.

Su visión es muy pobre y no pueden percibir los colores. En la órbita del ojo posee unas glándulas con forma de herradura llamadas glándulas Harderianas, cuando el ratón está en estrés, excreta en la zona periocular una sustancia de color marrón llamada porfirina.

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

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

Por su pequeño tamaño son muy susceptibles a cambios ambientales, puesto que una variación de la temperatura entre 2 a 3°C, puede afectar su temperatura corporal 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 y con un peso aproximado de 30 gr. Las crías al nacer tienen un peso aproximado de 1 a 2 g y gana rápidamente peso durante la lactancia.

Tienen una vida útil de 10 a 12 meses y se obtiene de ocho a diez camadas.

Los ratones son pequeños lo que produce cambios fisiológicos en respuesta a las fluctuaciones de la temperatura ambiente.

Demuestran la capacidad de anidar y jugar, lo que les ayuda a mantener la temperatura corporal. Generalmente, no pueden regular su temperatura corporal tan bien como los grandes mamíferos y son intolerantes al calor.

Las ratas y los ratones disfrutan de la interacción grupal. En las casas de los animales, la inserción o extracción de animales de una jaula implica un esfuerzo adicional para restablecer nuevos grupos. Esto se debe a que cada animal tiene su rol de dominante o dominado, desarrollando una jerarquía social. Se debe tener cuidado para asegurar la compatibilidad, especialmente entre ratones machos adultos, que pueden pelear, a menos que sean cruzados juntos desde el destete y se respete la densidad máxima de población por jaula.

Aun así, pueden producirse peleas entre ellos después de los dos meses de edad. En algunos linajes, por ejemplo, pueden producirse lesiones en la cola, la espalda baja u otras regiones. Las peleas también son comunes entre los machos reproductores de diferentes jaulas y agrupados en la misma jaula. Aunque la agresión en ratas es rara, los machos pelean más que las hembras. Los machos reproductores pueden pelear si provienen de diferentes jaulas y se agrupan. Dependiendo del linaje, en situaciones de superpoblación, se puede observar.

#### 6.1.1 Comportamiento del ratón

El ratón es un animal sociable y se mantiene en grupos sin ningún inconveniente, estos grupos deben formarse rápidamente luego del destete. Sin embargo, los machos de algunas cepas comienzan a mostrar su agresividad entre la séptima y décima semana de edad, aun cuando estos

grupos se hayan establecido al destete. En el grupo de machos existe uno dominante que puede ser muy agresivo. Las hembras generalmente no pelean, incluso cuando se hayan agrupado siendo ya adultas.

El acto de comer es cíclico, con un pico máximo durante el periodo de oscuridad. El mayor consumo de agua es durante las horas de oscuridad. El consumo de alimento y agua varía entre las cepas de ratones.

El ratón generalmente divide su caja en áreas específicas para dormir, comer, orinar y defecar.

Las hembras parturientas construyen un nido y permanecen mucho tiempo cerca de él o sobre las crías.

## 6.2 Peleas por disputas territoriales

En cuanto a las hembras, tanto ratas como ratones, pueden alojarse juntas a cualquier edad, incluso si proceden de diferentes jaulas o ya se utilizan como reproductoras, sin incidentes desfavorables. En general, las hembras solo luchan, en algunos casos, por defender a sus crías.

Un comportamiento común en las ratas es la postura de pie (Figura 2), utilizada para explorar el entorno y luchar (entre las ratas jóvenes, es una forma de jugar). Por este motivo, es importante que las rejas de la jaula sean altas, para permitir que las ratas observen fuera de la jaula, además de facilitar la cobertura de la hembra por parte del macho durante el apareamiento.



Figura 2 .Ratas en postura de pie observando el exterior de la jaula

Las ratas y los ratones tienen un hábito natural de coprofagia, es decir, ingieren sus propias heces, lo que puede alterar el efecto de la dieta sobre los resultados experimentales relacionados con la nutrición. Existe la posibilidad de que este comportamiento se vea incrementado por dietas deficientes, sin embargo, incluso con dietas adecuadas, puede ocurrir una re-ingestión de heces ya que es un comportamiento natural de los roedores. El uso de jaulas de alambre en experimentos no previene la coprofagia, ya que pueden eliminar las heces directamente del ano. Además, las pruebas de preferencia indicaron que los roedores prefieren los pisos con camas sólidas a los pisos de alambre. Los suelos de alambre no permiten que los animales desarrollen sus comportamientos normales, los vuelven inseguros y comprometen su bienestar. Si su uso es realmente necesario, su tamaño y espaciado deben ser proporcionales al tamaño del animal alojado, para minimizar el desarrollo de lesiones en la superficie plantar de las patas, asegurando la comodidad de los animales. Las especies tienen diferentes habilidades auditivas. Entre ellos, existe una variación

considerable en la audición de altas y bajas frecuencias. Algunos animales son capaces de captar frecuencias de sonido más altas que las captadas por los oídos humanos (ultrasonido), utilizándolas para comunicarse. Algo de ultrasonido producido por animales, como ratas y ratones, son inaudibles para los humanos, como el sonido que se produce en la comunicación sexual o para evitar que los polluelos se alejen del nido. Los cachorros se comunican con la madre mediante la emisión de vocalizaciones de alta frecuencia. Podemos escuchar otras vocalizaciones, como en el caso de las agresiones.

Los sonidos producidos, como el cortejo, el cuidado materno, la agresión y la defensa, pueden verse afectados por el nivel de ruido en el ambiente. Los animales pueden adaptarse a los ruidos continuos del entorno, pero los ruidos de larga duración, de alta intensidad o de tono alto son perturbadores y provocan estrés, cambios metabólicos, reducción de la fertilidad, canibalismo y daños en el sistema auditivo.

Algunos equipos utilizados en viveros y laboratorios emiten sonidos que pueden estresar a los animales sin nuestro conocimiento, como el Agua corriente o mangueras de presión. Las jaulas superpobladas también generan ultrasonidos, que pueden dificultar la comunicación entre los animales y provocar estrés.

Las ratas y los ratones son homeotérmicos, es decir, controlan la temperatura corporal, independientemente de la variación térmica del entorno, variando su tasa metabólica. Las variaciones bruscas de temperatura y humedad pueden provocar estrés, caída de la resistencia y mayor susceptibilidad a infecciones, provocando problemas respiratorios en animales mantenidos en alta humedad y / o bajas temperaturas. Los animales mantenidos por debajo de la temperatura ideal presentan constricción de los capilares superficiales, pilo erección, postura encrespada, aumento de la ingesta de alimentos y construcción de nidos.

Las ratas y los ratones tienen un ciclo circadiano. El patrón del ciclo de luz / oscuridad suele ser de 12 hs. de luz / 12 hs. de oscuridad. Este ciclo puede aumentarse a 14 hs. con fines de investigación. Son animales nocturnos, sin embargo, según algunos autores, el ratón, a diferencia de la rata, se alimentan durante el día, consumiendo la mayor parte de su alimento en el período de luz. Debido al ciclo circadiano, el cambio de jaula sucia de los animales debe mantenerse siempre al mismo tiempo, así como su manipulación durante las pruebas experimentales. Tienen buena visión, pero, al ser animales nocturnos, evitan la luz intensa. La luz puede afectar la fisiología, morfología y comportamiento de varios animales, y la iluminación inadecuada es estresante. Los animales albinos son más sensibles a las altas intensidades de luz, incluso si nos parece cómodo. A largo plazo, la luz intensa puede dañar sus retinas. El período de exposición a la luz puede afectar el comportamiento reproductivo de los animales, así como el peso y la ingesta de alimentos. Por lo tanto, los temporizadores se utilizan en viveros para controlar los ciclos de luz / oscuridad. Los cambios en este ciclo requieren dos semanas para adaptar los animales y deben realizarse de forma gradual, no brusca.

El sentido más desarrollado e importante de ratas y ratones es el olfato. A través de olores naturales o de orina, los machos demarcan territorio. Son capaces de identificar alimentos,

miembros del sexo opuesto, intrusos e incluso reconocer el olor de la persona que limpia su jaula y les da de comer. Por tanto, el experimentador debe evitar el uso de perfumes, anestésicos volátiles y la presencia de sangre fresca en delanteles o bancos. Además, durante un experimento, se recomienda no cambiar el técnico responsable de cambiar las jaulas. Si por casualidad hay un cambio de técnico o investigador, los roedores se vuelven más agresivos hasta que se adaptan a los olores de la nueva persona. También puede haber una caída en la producción animal. Las vibrisas largas (Figura 3) cercanas al hocico presentes en ratas y ratones funcionan como receptores táctiles y sirven para detectar la presencia de objetos a su alrededor, incluso si no tienen olor. Como es un animal nocturno, las vibrisas te permiten guiarlo en la oscuridad. La sensibilidad olfativa y la sensibilidad táctil (vibrissae) son los principales significados de estos animales, lo que les permite detectar alimentos, el sexo opuesto y los depredadores. El tacto también lo ejerce la superficie plantar de los pies. Cuando están estresados, los roedores se acercan a las superficies y se sienten más seguros. Las jaulas alambradas evitan el contacto con pisos sólidos, cambiando su comportamiento normal.



Figura 3. Vibrissae presente cerca del hocico del ratón.

Las ratas y los ratones no tienen glándulas sudoríparas. La cola juega un papel en la termorregulación, en la que la vasodilatación disipa el calor y la vasoconstricción lo conserva. En los animales recién nacidos (hasta el final de la primera semana de edad), no existen mecanismos termorreguladores. Se acurrucan junto a su madre y otros cachorros para mantener la temperatura ideal. Así, si son abandonados fuera del nido, pueden morir de hipotermia. Por esta razón, es muy importante que los recién nacidos utilizados en experimentos se utilicen de inmediato y luego se les practique la eutanasia tan pronto como se separen de la madre, debido a que no regulan la temperatura corporal (son poiquiloterms) y la ausencia de leche materna. Las dos regiones del estómago (gran estómago a glandular o anterior y la porción glandular) están separadas por un pliegue limitante que impide la capacidad de vómito facilitando los procedimientos de alimentación por sonda.

Poseen un hábito de acicalamiento, lo que hace que la secreción aceitosa producida por las glándulas cutáneas se distribuya por todo el cuerpo, manteniendo el pelaje limpio y brillante. La falta de este hábito indica que el animal tiene un problema. La cromodacriorexia es causada por la secreción de un pigmento rojizo (porfirina) en los ojos y la nariz, lo que indica sufrimiento o estrés (Figura 4). Esto puede ocurrir debido a la liberación de amoníaco en el medio ambiente por la falta de intercambio de jaulas, la falta de ventilación ambiental o la liberación de gases irritantes producidos por los productos de limpieza.



Figura 4. Secreción de porfirina en los ojos de ratas.

A los roedores les gusta jugar y es a través del juego que desarrollan su madurez emocional. Por lo tanto, se debe proporcionar suficiente espacio en las jaulas para que el animal se esconda o luche, de modo que pueda prepararse para situaciones estresantes en el futuro. Es de los padres y similares que aprenden los comportamientos normales de la especie. El barbeamiento es un comportamiento dominante observado en algunas razas de ratones que puede ser causado por un exceso de animales en la jaula, la edad de destete o dieta. El ratón dominante realiza la tricotomía de sus compañeros sumisos en la misma jaula, en diversas regiones como el hocico, el cuerpo o la cabeza. Generalmente, solo se observa un ratón con pelo normal (dominante) en relación a los demás. Al retirar al animal dominante, otro asumirá esta función. A pesar de este comportamiento, debe entenderse que los ratones son animales sociales y deben mantenerse en grupos compatibles.

Es importante conocer el comportamiento normal de estos animales para poder compararlo con el comportamiento del dolor. Las ratas y ratones pueden señalar que tienen dolor cuando presentan pérdida de peso, vocalización, postura encorvada, pilo erección, entre otros síntomas. Las hembras alojadas juntas en grandes cantidades, sin la presencia de machos, entrarán en la fase de anestro (ausencia de ciclos estrales), diestro o pseudoembarazo. Este efecto se llama Lee-Boot. Si están expuestos a las feromonas masculinas o al propio macho, comienzan a ciclar de 48 a 72 horas. Esta reacción se llama efecto Whitten y permite la sincronización de la ovulación en grupos de hembras. Estos comportamientos se observan más en ratones que en ratas.

Otro efecto frecuente en ratones es el de Bruce, en el que durante el apareamiento de las hembras por un macho, cuando se exponen a otro macho o a sus feromonas en 24 horas, se puede reabsorber el 50% de los embriones. Esto se debe a que la feromona del segundo macho parece inhibir el anidamiento, que es la implantación del huevo en la pared del útero, perturbando la secreción de prolactina. Estas hembras regresan al estro en cuatro a cinco días. Este efecto no se ve en ratas.

### 6.3 Comportamiento materno

Las hembras defienden a sus crías con tenacidad y, después del nacimiento de toda la camada, especialmente durante los primeros ocho a diez días, el comportamiento de la madre de lamer a las crías estimula sus funciones digestivas. Después del parto, se pueden ver manchas blancas en

el abdomen de los recién nacidos, lo que indica qué cachorros están ingiriendo la leche. Este es un factor importante en el caso de la selección al nacer. El comportamiento materno en ratas es muy fuerte y confiable (Figura 5).

Los cachorros son amamantados 18 horas al día durante la primera semana de nacimiento. La madre lame a los polluelos para despejar las vías respiratorias y, una vez finalizado el parto, coloca todos los polluelos en el nido. Las ratas lamidas por sus madres al nacer se vuelven más pacíficas, menos temerosas y menos adultas estresadas; además, las ratas que fueron lamidas por la madre cuando los cachorros suelen adoptar el mismo comportamiento cuando tienen a sus crías.



Figura 5. Hembra amamantando

El manejo de los neonatos debe ser rápido, pero con precaución, para evitar que la madre disminuya su cuidado y deje de lamerlos. En las ratas, la madre suele llevarlas de un lado a otro durante el intercambio de cajas sucias o durante la observación de la arena (Figura 6). Cuando se produce este comportamiento, se debe mantener la distancia de la jaula, reduciendo el ruido. Por lo general, la madre adopta este comportamiento para tratar de encontrar un espacio donde pueda colocar al recién nacido de manera segura. Sin embargo, si ocurre muchas veces, puede lastimarlos.



Figura 6. Hembra de la pareja de ratas Wistar que llevan a las crías para protegerlas

El canibalismo de los neonatos depende del linaje y, en muchos casos, se puede minimizar cuando los animales se encuentran en un lugar tranquilo, con poca intensidad lumínica y cuentan con material para hacer su nido, como se comentará a continuación. Es más probable que las hembras primíparas rechacen la camada. Los recién nacidos débiles, nacidos muertos o muertos después del nacimiento pueden ser devorados por la madre, ya que sirven como fuente de proteínas; la madre también puede dejarlos vivos con los demás polluelos o, para mantener limpio el nido, rechazarlos y segregarlos en la esquina de la jaula. Para evitar el canibalismo, a la hora de manipular a los recién nacidos, se sugiere frotar las manos en las virutas sucias de la jaula al reponerlas en el nido, para que la hembra no encuentre extraño el olor del guante. Además, se

deben evitar los recién nacidos en el momento del nacimiento, cuando todavía están cubiertos de sangre. Varios factores, como linaje, ruidos fuertes en el ambiente, madres mayores (más hasta los 11 meses de edad), manejo inadecuado, intercambio muy frecuente de jaulas, presencia de nuevo entrenador, falta de agua o alimentos, movimiento indebido de la jaula, mala alimentación y desnutrición de madres lactantes, pueden llevarlas a la práctica del canibalismo en cachorros.

#### 7. Alojamiento y enriquecimiento ambiental

Como son sociables, las ratas y ratones deben alojarse en grupos, evitando el aislamiento, para asegurar que desarrollen un comportamiento y fisiología normales. Un alojamiento adecuado que considere el entorno físico y social de estos animales, así como colonias bien supervisadas y un manejo adecuado, son indispensables para la producción de animales de alta calidad.

Las necesidades físicas de los animales se satisfacen con una dieta equilibrada, un clima controlado y buenas condiciones de higiene, pero puede producirse estrés si su comportamiento se restringe en las condiciones estándar de alojamiento.

Las jaulas de laboratorio generalmente no son adecuadas para las necesidades psicológicas y de comportamiento de los animales. Los hábitos de los roedores de explorar, descansar, trepar, limpiar, buscar comida, anidar y comportarse socialmente no se consideran completamente. En los galpones de animales, se preocupa principalmente por el establecimiento de estándares de bioseguridad y por la modernización de los alojamientos, con el objetivo de minimizar variables como enfermedades infecciosas, exposición a toxinas o variaciones en el medio. Sin embargo, esta estandarización en el manejo de roedores tiene consecuencias adversas para los animales en cuanto a la falta de complejidad en su entorno, limitando la capacidad de los animales para controlar su entorno físico y social.

¿De que se habla con enriquecimiento ambiental?

El enriquecimiento ambiental se puede definir como un cambio en el entorno de los animales cautivos, brindándoles oportunidades para expresar sus comportamientos naturales. Es el término utilizado para definir acciones que tienen como objetivo la mejora del medio ambiente, reconociendo el potencial problema de bienestar asociado a la restricción de comportamiento en los sistemas habitacionales. La introducción de enriquecimiento ambiental para roedores es un método utilizado para mejorar la calidad de vida y el bienestar de estas especies cautivas permitiéndoles expresar los comportamientos específicos de la especie. Sin embargo, el cambio solo puede ser considerado "enriquecimiento" si enfatiza el bienestar animal y mejora su funcionamiento biológico. En 1959, Russel y Burch ya consideraban el enriquecimiento como una necesidad ética en el entorno de los animales de laboratorio, con el objetivo de introducir el refinamiento tanto en la creación como en la experimentación.

Los animales mantenidos en ambientes altamente artificiales son modelos menos adecuados para extrapolar los resultados experimentales a los humanos. Los animales mantenidos en ambientes enriquecidos, en cambio, pueden ser más estables tanto en los aspectos fisiológicos como

psicológicos, así como mejores representantes de las especies, asegurando mejores resultados científicos

Para evaluar las estrategias de enriquecimiento, primero se debe comprender la historia, el repertorio natural, el estilo de vida y la complejidad del comportamiento de la especie en cuestión. El enriquecimiento ambiental no es un lujo opcional, sino que se ofrece para satisfacer las necesidades conductuales de los mamíferos, permitiéndoles expresar su comportamiento, lo que se reflejará en fisiología e incluso inmunología. Por ello, el enriquecimiento debe satisfacer curiosidades, brindar actividades divertidas, permitir la ejecución de necesidades fisiológicas y conductuales, como mantener relaciones sociales, descansar, construir nidos, explorar, comer, roer y esconderse. Es sumamente importante evaluar los beneficios para el animal y las preferencias del animal a la hora de elegir un determinado tipo de enriquecimiento, así como los efectos que este puede tener sobre el comportamiento típico de la especie, sobre los parámetros fisiológicos, además del impacto en los resultados y análisis científicos. Estadísticas. El resultado dependerá del linaje, el tipo de enriquecimiento y el parámetro evaluado. Por ejemplo, diferentes cepas de ratones reaccionan de manera diferente a un tipo de enriquecimiento.

El enriquecimiento debe permitir que los animales se sientan completamente seguros. Por ejemplo, las ratas y los ratones necesitan grietas o algún material de anidación para poder construir escondites. Además, estas especies pueden sentirse seguras si tienen contacto físico con sus parejas. A pesar de muchas generaciones de domesticación, los hábitos de cavar y hacer nidos persisten en estos animales. Las pruebas de preferencia pueden ser útiles para evaluar los tipos de enriquecimiento, ya que permiten a los animales elegir entre varias opciones, además de prevenir la introducción de elementos nocivos o de ningún interés para los animales.

### 7.1 Tipos de enriquecimiento ambiental

Los tipos de enriquecimiento se clasifican generalmente en social y físico

#### 7.1.1 Enriquecimiento social

El enriquecimiento social incluye la socialización de los animales, con o sin contacto, con coespecíficos o contra específicos, incluidos los seres humanos.

Los seres humanos somos parte del enriquecimiento social de los animales de laboratorio, y la manipulación de los animales es un aspecto muy importante en la rutina diaria.

##### a. Enriquecimiento con el contacto social

Las especies gregarias (que viven en grupos o en bandadas) deben alojarse en grupos o parejas con coespecíficos, armoniosamente. Si se alojan individualmente, se ven privados de expresar sus comportamientos sociales típicos. Como son sociables, las ratas y los ratones deben alojarse en grupos, evitando el aislamiento, para asegurar que desarrollen un comportamiento y fisiología normales. Como se mencionó anteriormente, aunque esta no es una situación natural para los machos, en algunas cepas, especialmente las de ratones, la agresividad es un problema y los machos necesitan ser separados. Por tanto, la inclusión más compleja en una jaula es la de otro

animal, ya que la interacción entre ellos puede ser impredecible. Además, los grupos muy grandes son más propensos a las enfermedades y la agresividad.

b. Enriquecimiento sin contacto social

Este tipo de enriquecimiento incluye la comunicación visual, auditiva y olfativa con co-específicos o contra-específicos (a través de barreras o rejillas), sin contacto social, cuando el acomodo grupal no es posible. Por ejemplo, si una rata se aloja aisladamente, puede mantener un contacto visual, olfativo y auditivo con otros ratones para aliviar el estrés asociado con el aislamiento.

### 7.1.2 Enriquecimiento físico

El enriquecimiento físico incluye jaulas complejas y estímulos sensoriales y nutricionales.

a. Complejidad

Proporcionar una estructura adecuada en la jaula es más beneficioso para los animales, ya que lo usan en conductas específicas, que ofrecer un área amplia, donde no usan todo el espacio (excepto en actividades locomotoras). La mayoría de los roedores tienden a dividir su área en lugares para alimentarse, descansar y excretar. Estas divisiones pueden facilitarse mediante estructuras dentro de la jaula (ejemplo: refugios, cajas nido, tubos, materiales de nido, plataformas, etc.)

Existen varios tipos de enriquecimiento para animales de laboratorio que se pueden improvisar (Figuras 7, 8,9). Las cajas de animales se pueden enriquecer fácilmente con artefactos adaptados, como tubos del tamaño adecuado y materiales de anidación libres de toxinas (como el algodón). Aún existen controversias sobre el uso de tubos de PVC.

Las ratas, a diferencia de los ratones, no muestran interés en construir nidos, a excepción de las hembras que acaban de parir. Según las pruebas de preferencia, las ratas prefieren objetos que se puedan masticar, como un trozo de madera con agujeros.

Es importante ofrecer a los ratones materiales para la construcción de nidos, ya que esto les permite crear microambientes adecuados para el descanso y la reproducción. Los ratones son capaces de modificar el microambiente en sí, porque pueden acurrucarse y manipular sus nidos, ejerciendo control sobre las condiciones de temperatura, humedad y luz.

Los materiales utilizados en la construcción de los nidos también brindan sombra, además de ayudar a regular la temperatura y servir de refugio para que los animales se escondan de las coespecíficas, evitando agresiones y controlando el ambiente. Los ratones alojados en condiciones estándar de laboratorio (temperatura de  $22 \pm 2$  °C) no podrán manipular su microambiente y dejarlo en las condiciones preferidas si no encuentran materiales adecuados para la construcción de su nido.

Los materiales utilizados en la construcción del nido deben ser acordes a las necesidades de los ratones, por lo que deben tener las siguientes características: no deben ser tóxicos ni causar daño al animal; deben ser absorbentes, pero no hasta el punto de deshidratar al recién

nacido; no deben contener polvo excesivo; deben ser económicos; no deben ser comestibles, para evitar interferencias en los experimentos; deben ser duraderos o desechables; deben estar libres de toxinas u otros contaminantes; y deben poder esterilizarse o descontaminarse.



Figuras 7,8 y 9

La introducción de copos de algodón en jaulas permite a los ratones construir sus nidos y refugios, como si estuvieran en su entorno natural, mejorando su bienestar. Además de ser un material económico, el algodón es fácil de cambiar durante la limpieza de las jaulas, no es tóxico, es absorbente, puede esterilizarse en autoclave y no daña a los recién nacidos.

#### b. Sensorial

El enriquecimiento sensorial incluye estímulos visuales, auditivos, olfativos, táctiles y gustativos. Quizás el enriquecimiento más satisfactorio para roedores sea la comunicación visual, auditiva, olfativa y táctil con co-específicos o contra-específicos, directamente o a través de rejilla. Se ha sugerido que un ruido de fondo constante durante algunas horas del día (por ejemplo, una música de radio en volumen de 85 dB) ofrece algunos beneficios en la creación, disminuyendo la excitabilidad de los animales y reduciendo el efecto de sustos repentinos de ruido. La limpieza de las jaulas es una rutina en las instalaciones de los animales; Sin embargo, la eliminación de las marcas olfativas perturba la jerarquía social de los animales en la jaula, a menudo resultando en un pico de agresión entre los ratones machos. Se ha demostrado que transferir una pequeña porción del material al nido antes de limpiar la jaula ayuda a reducir la agresión. Es posible realizar estimulación táctil aportando materiales de nido que puedan servir de refugio y ofrecer una oportunidad de excavación, además de lugares donde puedan refugiarse de la luz, ya que son animales nocturnos y, en la mayoría de los casos, albinos.

#### c. Nutricional

La forma de enriquecimiento más obvia es aquella en la que el animal tiene alguna recompensa, como la comida. Si el alimento se utiliza para tratamientos o enriquecimiento ambiental, se debe tener cuidado de que ninguna variación en la dieta pueda afectar los resultados experimentales, asegurando que los animales tengan una dieta balanceada. Los alimentos le dan al animal la oportunidad de buscar comida (como la comida esparcida en la cama) ayudan a evitar el aburrimiento, ya que, en la naturaleza, gran parte del tiempo se dedica a esta actividad. El enriquecimiento es ventajoso para el uso de animales, ya que satisfacen sus necesidades de comportamiento. Puede ser preferible utilizar uno o dos individuos más en un experimento,

debido a la variación adicional que provocará el enriquecimiento ambiental, siempre que exista una perspectiva completa de bienestar. El enriquecimiento ambiental es importante tanto desde el punto de vista ético como científico. Desde un punto de vista ético, mejora el bienestar del animal. Desde un punto de vista científico, evita que los animales muestren comportamientos anormales, que pueden influir fisiológicamente en los resultados experimentales. Actualmente, el enriquecimiento ambiental da como resultado animales más normales en todos los sentidos y mucho más aptos para la cría y la experimentación.

#### 8. Sección de experimentación

En cuanto al manejo de animales, se aconseja que los estudiantes sean abordados, manipulados y contenidos con cuidado y profundo respeto, y se deben tomar todas las precauciones posibles para asegurar el mínimo de estrés durante el manejo.

La administración de fármacos, anticuerpos, células u otros agentes representa un paso fundamental en el proceso de evaluación de la actividad biológica en animales. Estos procedimientos se utilizan ampliamente en la sección de experimentación. Al elegir la mejor vía de administración, se deben tener en cuenta las características químicas y físicas de la sustancia, ya que la vía de administración depende de las propiedades de la sustancia y del propósito del estudio. También se debe prestar especial atención a la concentración, pH, viscosidad, esterilidad, pirogenicidad y toxicidad de las sustancias, así como a la existencia de elementos potencialmente peligrosos. Conocimiento de los métodos y técnicas disponibles para la administración de sustancias, así como las características de su metabolismo de distribución tisular, permite al investigador seleccionar la ruta más adecuada para el propósito de su estudio. Entre las diversas posibilidades de administración de sustancias a roedores, las vías más habituales son: inyecciones oral (VO) y por sonda, subcutánea (SC), intramuscular (IM), intravenosa (IV) e intraperitoneal (IP). La ruta debe seleccionarse y entrenarse antes del inicio de cualquier experimento.

Desde el momento en que los animales solicitados por el investigador son entregados a la sala experimental en uso, se recomienda un período de adaptación de una a dos semanas. La adaptación brinda a los animales la oportunidad de recuperarse del transporte y aclimatarse a su nuevo entorno. Durante este período, el operario debe manipularlos para que se adapten a su rutina de olor y manipulación e introducir formación sobre las técnicas y procedimientos que se realizarán. El conocimiento de las técnicas que se realizarán en los animales y el entrenamiento previo garantizan la máxima calidad del resultado de los procedimientos

#### 9. Principales vías de administración de sustancias.

- Oral

El método más simple de administración oral es administrar la sustancia mezclada a los alimentos o al agua potable. Se debe conocer la cantidad de alimento y agua que ingiere el animal para calcular la sustancia a mezclar.

- Gavagem

La aguja de punta de bola se usa para evitar daños en el esófago. El animal es inmovilizado manualmente, siendo fundamental en este procedimiento la inmovilización de la cabeza. La aguja se introduce lentamente en la cavidad bucal, a través de la boca y la faringe hasta el esófago. No se debe sentir ninguna resistencia y se debe garantizar que el tubo no penetre en la tráquea (Figura 10).

La sustancia debe administrarse lentamente. Los roedores comen y beben muchas veces al día. Por esta razón, rara vez tienen el estómago vacío. Como la máxima distensión del estómago se produce al final del período de oscuridad y la cantidad mínima al final del período de luz, se deben administrar pequeños volúmenes.

Al comienzo del período claro. El volumen indicado es de 1 mL de solución por cada 100 g de peso corporal. Si la solución es acuosa, este volumen puede ascender a 2 mL por cada 100 g de animal.



Figura 10. Gavage en ratón

- Administración subcutánea

La administración subcutánea es fácil y rara vez dolorosa. La tasa de absorción es menor en comparación con las vías intraperitoneal e intramuscular. Esta administración generalmente se realiza sobre la piel flácida de las áreas dorsolaterales del cuello, hombros y flancos. En este procedimiento, el animal es inmovilizado manualmente y luego, apoyado sobre una toalla o superficie limpia, se inserta la aguja debajo de la piel suelta, se agarra con el pulgar y el indicado, y luego se inyecta la sustancia (Figura 11). AB

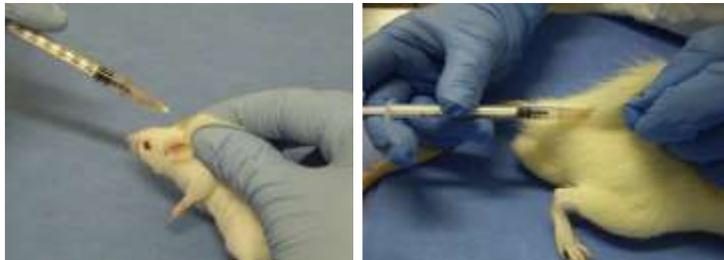


Figura 11. A) Inoculación subcutánea en la región de la piel del cuello; B) Inoculación subcutánea en la región del flanco

- Administración intramuscular

Esta ruta se utiliza para volúmenes pequeños, ya que el músculo de ratas y ratones es pequeño. La sustancia se inyecta en el músculo de la parte posterior de las patas traseras y debe dirigirse lejos

del fémur y el nervio ciático. Cuando el animal está anestesiado o inmovilizado manualmente, la punta de la aguja se inserta a través de la piel y dentro del músculo. Aspire brevemente con la jeringa antes de inyectar la sustancia, para asegurarse de que la sangre no regrese, en caso de que la aguja penetre en un vaso (Figura 12).



Figura 12. Inoculación intramuscular

- Administración intravenosa

La sustancia se administra directamente en el torrente sanguíneo del animal. La ventaja de esta vía sobre las demás es que se pueden administrar soluciones con pH alto o bajo y se absorben más rápidamente. La administración es generalmente lenta, evitando que la solución se escape de la vena. Esta técnica, aunque parece simple, requiere conocimiento y habilidad por parte del operador. El procedimiento consiste en llenar primero la jeringa con una aguja, y también se puede utilizar un catéter con la solución a inyectar, evitando la formación de burbujas de aire. La administración suele realizarse en la vena lateral de la cola del animal, y no en la vena dorsal de la cola, ya que no es una línea recta. Las venas laterales son fácilmente visibles, pero tienen un diámetro pequeño. Si no se usa anestesia, se debe usar un dispositivo de contención artificial. Luego, la cola se calienta con una lámpara o toalla tibia o incluso se sumerge en agua tibia (40 ° C). Para dilatar los vasos, limpie la cola con alcohol al 70% en una gasa o hisopo de algodón.

Inserte la aguja paralela a la vena de la cola, penetrando de 2 mm a 4 mm en el lumen, manteniendo el bisel de la aguja hacia arriba. Luego, la solución se inyecta lentamente y no se debe sentir ninguna resistencia. Al final de la administración mantener presionada la zona con una gasa o hisopo de algodón, para evitar el reflujo de la solución o sangre (Figura 13).

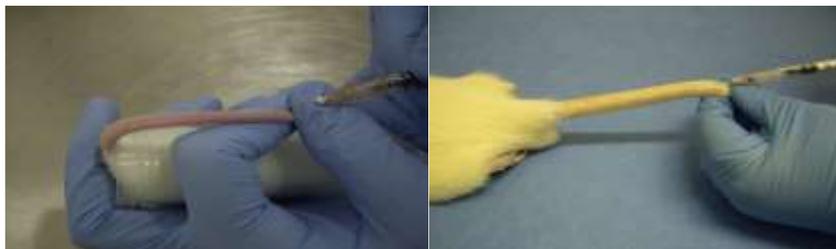


Figura 13. A) Inoculación intravenosa en la cola del ratón; B) Inoculación intravenosa en la cola del ratón

- Administración intraperitoneal

El animal debe estar contenido por la espalda, como se describe en el ítem “Contención manual”. Con sujeción, el animal se coloca con la cara ventral hacia arriba. Por lo general, la inyección se aplica en el cuadrante posterior del abdomen, en el lado derecho del animal y en el lado izquierdo del operador. La sustancia se inyecta en la cavidad peritoneal entre los órganos abdominales. Algunas limitaciones de la vía intraperitoneal son la sensibilidad del tejido a sustancias irritantes y menor tolerancia a soluciones de pH no fisiológico, sin embargo es una vía que soporta grandes volúmenes (Figura 14).



Figura 14. A) Cuadrante inferior izquierdo La mejor área para aplicar a inoculación intraperitoneal; B) Inoculación intraperitoneal en ratón; C) Inoculación intraperitoneal en ratas.

- Administración intradérmica

Esta ruta generalmente no se recomienda y debe restringirse a casos de absoluta necesidad.

El animal debe ser anestesiado y, posteriormente, se realiza una tricotomía del lugar de administración, que puede ser una pequeña zona en el lomo, el abdomen ventral o las patas traseras; estos deben limpiarse con alcohol al 70% sobre una gasa o algodón.

La piel del animal se estira con el pulgar o el índice y la aguja se inserta justo debajo de la capa superficial de la epidermis. La inyección se puede ver por la formación de una burbuja en la piel del animal. El volumen a administrar es de 0,05 mL por punto de administración (Figura 15).



Figura 15. Inyección intradérmica en el ratón (Fuente: Disponible en: [http://www.theodora.com/rodent\\_laboratory/injections.html](http://www.theodora.com/rodent_laboratory/injections.html))

- Administración intracerebral

El animal se anestesia y luego se sujeta manualmente sobre una superficie sólida. El lugar de administración está a la mitad de la distancia entre el ojo y la oreja del animal. La aguja perfora el

cráneo del animal directamente. El volumen a administrar es de hasta 0,03 mL por sitio de administración

- Administración intranasal

El animal debe estar ligeramente anestesiado y sujetado manualmente, con la cabeza elevada. La punta de la pipeta se coloca en las fosas nasales externas y luego la solución se pasa lentamente a las fosas nasales. El volumen a administrar es de 0,02 mL por punto de administración (Figura 16).



Figura 16. Administración intranasal en ratón

### 10. Recolección de sangre

Existe una variedad de técnicas de recolección de sangre tanto para ratas como para ratones. Sin embargo, para la mejor elección de la técnica, se deben conocer algunos parámetros relacionados con los animales como:

- Especie
- Tamaño del animal
- El tipo de muestra requerida (suero, plasma, células enteras)
- La calidad de la muestra requerida (esterilidad, contaminación de fluidos).
- Cantidad de sangre requerida
- Frecuencia de muestreo
- Estado de salud del animal
- Entrenamiento y experiencia del operador
- Efecto de la inmovilización o anestesia sobre el parámetro arterial medido

La frecuencia y el volumen aceptables de extracción de sangre dependen del volumen de sangre circulante total de los animales y de la cantidad de glóbulos rojos (RBC). Como representativo del volumen de sangre total, calculado en peso del 10% de los ratones y del 6% al 8% en peso de los ratones. Del volumen de sangre circulante, aproximadamente el 10% del volumen total se puede extraer de forma segura cada dos a cuatro semanas; El 7,5% de ese volumen se puede eliminar cada siete días; y 1% cada 24 horas. La recolección de volúmenes mayores a los recomendados, se debe presentar una justificación y reposición de líquidos y sustitutos celulares. Es importante señalar que el volumen de sangre se recupera en 24 horas, pero los eritrocitos vuelven a niveles normales en solo dos semanas.

Tabla 1. Volumen de sangre aproximado e intervalos entre recolecciones

Peso del animal (g)	Volumen de sangre circulante (mL)	1% (mL) A cada 24 h	10% (mL) A cada dos semanas
20	1,10-1,40	0,011-0,014	0,11-0,14
25	1,37-1,75	0,014-0,018	0,14-0,18
30	1,65-2,10	0,017-0,021	0,17-0,21
35	1,93-2,45	0,019-0,025	0,19-0,25
40	2,20-2,80	0,022-0,028	0,22-0,28
125	6,88-8,75	0,069-0,088	0,69-0,88
150	8,25-10,50	0,082-0,105	0,82-1,0
200	11,00-14,00	0,11-0,14	1,1-1,4
250	13,75-17,50	0,14-0,18	1,4-1,8
300	16,50-21,00	0,17-0,21	1,7-2,1
350	19,25-24,50	0,19-0,25	1,9-2,5

### 10.1. Recolección de sangre no terminal

#### 10.1.1 Retroorbital

No se recomienda este procedimiento, ya que el animal puede quedar ciego si el operador no está bien entrenado. Por tanto, su uso debe estar muy bien justificado. El animal debe ser anestesiado y sujetado manualmente. El animal se apoya sobre una superficie lisa y se penetra con una pipeta Pasteur o un tubo capilar en un ángulo de 45 ° en la esquina del ojo, debajo del globo ocular. El capilar gira ligeramente durante la entrada y se espera que la sangre fluya a través de un tubo. El procedimiento es rápido, el volumen de sangre extraído es de mediano a grande y se obtiene una buena calidad de la muestra. Debe esperar al menos diez días para que se repare la tela antes de repetir la recolección. Además de la anestesia general, se puede utilizar un anestésico oftálmico de propacaína o tetracaína (Figura 17).

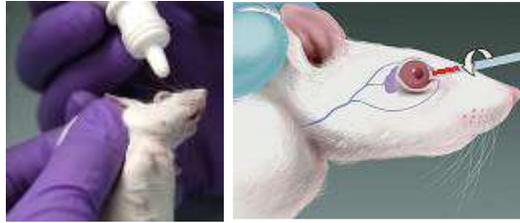


Figura 17. A) Anestésico oftálmico; B) Colecta de sangre via retro-orbital (Fuente: Disponible em: [http://www.theodora.com/rodent\\_laboratory/blood\\_collection.html](http://www.theodora.com/rodent_laboratory/blood_collection.html))

### 10.1.2 Mandibular (vena facial)

Esta ruta está limitada a ratones adultos y el volumen de sangre obtenido es de mediano a grande. La muestra se presenta como una mezcla de sangre arterial y venosa. Para esta técnica no se recomienda el uso de anestesia, por lo que no hay relajación facial y el consecuente cambio en la posición del plexo sanguíneo. Dependiendo de la necesidad del experimento, se pueden usar agujas de varios calibres para controlar la cantidad de sangre recolectada, incluso una lanceta n. ° 11. En este procedimiento, inserte la aguja o lanceta justo detrás y debajo de la marca masetera, ubicada en la zona de las mejillas del animal. Para finalizar el procedimiento, se utiliza una gasa estéril para detener el sangrado (Figura 18).



Figura 18. Colecta de sangre en la vena facial de Ratón

### 10.1.3 Vena safena

Se puede utilizar tanto en ratas como en ratones, perforando la vena safena con una aguja. El volumen de sangre obtenido es de pequeño a mediano y la calidad de la muestra es variable. Debe haber una contención eficaz del animal, que no requiera el uso de anestésicos. La vena safena se encuentra en la superficie externa del muslo. Para una mejor visualización, se debe quitar el pelo de la región del muslo del animal. El ratón se puede contener en un tubo de 50 ml cortando el extremo del tubo para que el animal pueda respirar. El ratón se inserta en este tubo con la cabeza hacia adentro, lo que favorece el manejo de sus patas traseras. Para visualizar la vena, la parte que está justo por encima del muslo del animal está adherida como si fuera una cruz; luego, se puede aplicar un lubricante para facilitar la recolección. Insertar la aguja y recoger las gotas de sangre que aparezcan (Figura 19).



Figura 19. Localización de la vena safena lateral (Fuente: Disponible en: [http://www.theodora.com/rodent\\_laboratory/blood\\_collection.html](http://www.theodora.com/rodent_laboratory/blood_collection.html))

#### 10.1.4 Vena de la cola

Esta recolección se puede realizar tanto en ratas como en ratones. La calidad de la muestra es variable y puede estar contaminada con tejido o piel, y se reduce en proporción al sangrado prolongado y al tiempo de ordeño de la cola. Se pueden utilizar agujas de pequeño calibre o canulación de las venas. El primer paso es colocar al animal en un recipiente o anestesiarlo. Luego, se aplica una gasa con alcohol al 70%. La cola debe calentarse para que se produzca la vasodilatación. Este calentamiento se puede realizar con una lámpara caliente o incluso sumergiendo la cola en agua caliente (alrededor de 35 ° C). Se localiza una de las venas laterales de la cola y, con el bisel hacia arriba, casi paralelo a la vena, se introduce la aguja unos 2 mm en la vena (Figura 20). Para volúmenes pequeños, es posible amputar la cola de aproximadamente 1 mm en ratones y 2 mm en ratas. Para medir la glucosa en sangre, en la que solo se necesita una gota de sangre, se puede pinchar con una aguja (insulina o 22G), como se hace en el dedo índice humano.



Figura 20. A y B) Colecta de sangre de vena de la cola

#### 10.1.5 Vena yugular

Esta ruta está limitada a ratas, siendo el volumen obtenido de medio a grande con buena calidad de muestra. Primero se debe anestesiarse y sujetar al animal para que permanezca la cabeza hacia arriba. El vello del cuello (lugar de la punción) se puede quitar o humedecer con alcohol al 70%. Con el cuello estirado, se localiza la vena yugular y se extrae sangre con una jeringa de 1 mL, insertando la aguja de 1 mm a 3 mm de profundidad.

## 10.2 Recolección de sangre terminal con anestesia profunda

### 10.2.1 Punción cardiaca

Este procedimiento se puede realizar tanto en ratas como en ratones. Se obtiene una buena cantidad de sangre, formada por una mezcla de sangre arterial y venosa. Después de la anestesia profunda de los animales, verificada con la prueba de sensibilidad a estímulos dolorosos, se coloca al animal en decúbito supino y se pasa una gasa humedecida en alcohol al 70% por todo el largo de su tronco. Se desliza el pulgar sobre el tronco del animal, hasta que ya no sea posible palpar los cartílagos xifoides. Luego, la aguja se inserta en un ángulo de 45 ° con una ligera inclinación hacia la izquierda. Cuando aparece una mancha de sangre, se tira lentamente del émbolo; la sangre fluirá por sí sola, por lo que no es necesario tirar de ella con fuerza. (Figura 21).



Figura 21 A) Punción cardiaca en ratón; B) Localización de corazón en ratón (Finte: Disponible en: [http://www.theodora.com/rodent\\_laboratory/blood\\_collection.html](http://www.theodora.com/rodent_laboratory/blood_collection.html))

### 10.2.2 Aorta abdominal

Después de una anestesia profunda, el animal se coloca en posición supina, sosteniendo sus patas con agujas, como en los procedimientos quirúrgicos. Se descontamina toda la extensión del pecho y el abdomen del animal con alcohol al 70%. Luego, se abre la piel y luego el peritoneo sosteniéndolo con agujas. Los órganos del abdomen se empujan hacia un lado para poder ubicar la vena. La aguja se coloca suavemente en la vena para que no reviente, tirando de ella lentamente. (Figura 22).



Figura 22. Punción de la aorta abdominal de la rata.

### 10.2.3 Venosección (axilar)

Se extrae sangre de los vasos axilares, colocando al animal anestesiado sobre una superficie lisa. Luego, extienden sus extremidades, fijándolas con una aguja. Se hace una incisión profunda en la axila del animal, en el costado del pecho, sujetando la piel en la parte posterior de la incisión con fórceps, para crear un caparazón en la región. La sangre se extrae con pipetas.

### 11. Anestesia y analgesia

La preocupación por el bienestar de los animales utilizados en la investigación científica se ha incrementado significativamente, tanto con el objetivo de reducir el dolor y el sufrimiento de los animales como de mejorar la calidad de los resultados experimentales. Cuando se realizan experimentos con animales, suele haber algún tipo de malestar, que conviene minimizar al máximo. El uso de protocolos eficaces de anestesia y analgesia garantiza el perfeccionamiento de los proyectos de investigación, reduciendo la angustia, el dolor y el sufrimiento animal. Existe una gama de agentes anestésicos y analgésicos disponibles para su uso en animales de laboratorio; sin embargo, se deben tomar consideraciones cuidadosas al elegir el mejor agente, ya que la selección de un agente anestésico o técnica anestésica en particular dependerá de varios factores, algunos de los cuales están directamente relacionados con interacciones potenciales con el protocolo de investigación y su capacidad para producir una profundidad anestésica adecuada. También deben tenerse en cuenta algunos factores prácticos, como la experiencia del personal involucrado y la disponibilidad del equipo necesario.

Independientemente del método elegido, debe tenerse en cuenta que los dos objetivos principales de la anestesia son evitar el dolor y proporcionar moderación humanitaria. Por lo tanto, el agente anestésico elegido debe ser uno que cause el menor sufrimiento y malestar al animal. La selección de un método de anestesia que tenga menos probabilidades de interferir con un protocolo de investigación en particular puede ser una de las tareas más difíciles.

El investigador debe ser consciente de los efectos fisiológicos que aportan dichos anestésicos para tratar de minimizar las interacciones entre la técnica anestésica y el protocolo de investigación. Es importante tener en cuenta que ningún agente anestésico es completamente eficaz y seguro. La simple adopción de un método de anestesia, descrito en publicaciones que tratan el mismo modelo animal de interés, no garantiza el éxito de la técnica. La propuesta es que se realice primero una evaluación del anestésico elegido, y luego de la interacción del anestésico con el modelo animal y con el protocolo de investigación. El proyecto piloto a menudo facilita la estandarización de la técnica anestésica. Existe una renuencia a perfeccionar las metodologías anestésicas, porque se cree que los anestésicos utilizados en la nueva técnica pueden afectar el modelo animal elegido y el período posquirúrgico. En algunos casos, esta creencia es cierta y tiene una base científica, pero los efectos de la anestesia deben sopesarse con los efectos del estrés quirúrgico. Las preocupaciones son similares con respecto al uso de analgésicos en el período posquirúrgico y, una vez más, los efectos secundarios de los analgésicos deben considerarse junto con los efectos del estrés y el dolor en el período posquirúrgico.

### 11.1 Planificación y cuidado

En todas las situaciones en las que es necesario anestésicar a un animal, es muy importante que el investigador planifique y ponga en práctica de forma eficaz los cuidados adecuados antes, durante y después de cada procedimiento. El uso de agentes anestésicos cambia significativamente la fisiología del animal y, sin los cuidados necesarios y la debida planificación, el resultado puede ser desastroso. El grado de los cambios provocados varía, pero cada agente anestésico genera hipotermia y disminución de la actividad cardiovascular (bradicardia) y respiratoria (bradipnea). Tras el procedimiento, estos cambios persisten hasta la recuperación del animal, por lo que es necesario cuidar al animal inmediatamente después del procedimiento y, en algunos casos, durante unos días más después. El tiempo de recuperación del animal varía según el agente utilizado.

### 11.2 Pre-procedimiento

Antes de iniciar un procedimiento que requiere el uso de agentes anestésicos o sedantes, los investigadores deben evaluar algunos factores:

- Los factores relacionados con el animal, edad, sexo, especie, temperamento, linaje, estado de salud.
- Factores relacionados con el procedimiento: se deben considerar los siguientes: la técnica seleccionada y la duración del procedimiento; el grado de dolor / malestar que el procedimiento puede causar en el animal; la formación de las personas implicadas.
- Factores relacionados con el laboratorio, considerar si el entorno y los materiales disponibles son adecuados para llevar a cabo el procedimiento.
- Factores relacionados con el período posterior al procedimiento, los anestésicos pueden causar efectos indeseables en el animal. En los casos en los que el procedimiento no es terminal, es decir, el animal debe recuperarse de la anestesia, es importante conocer cuáles son los efectos esperados de la administración del anestésico elegido.

Dependiendo del caso, es necesario administrar medicamentos como antibióticos (cuando sea necesario minimizar el riesgo de infección en el postoperatorio) y analgésicos, antes de iniciar el procedimiento. Cabe recordar que, antes de iniciar cualquier procedimiento con los animales, reservar al menos siete días (preferiblemente catorce días) para la aclimatación al nuevo ambiente, incluso si el animal solo se ha movido de una sección a otra dentro del mismo vivero. En roedores no es necesaria la restricción alimentaria, ya que la anatomía del estómago de estas especies les impide vomitar. La restricción alimentaria solo debe ocurrir si es realmente necesario y se especifica en el protocolo de investigación. En el caso del suministro de agua, la restricción debe ocurrir al menos 60 minutos antes de la inducción anestésica. En los casos en que sea necesaria la restricción alimentaria, se debe considerar que los roedores realizan coprofagia (ingestión de heces). Incluso si se toman medidas para evitarlo durante el período de restricción, como el uso de jaulas metabólicas, el animal es capaz de eliminar las heces directamente del ano. Si es posible, se debe pesar al animal antes del procedimiento anestésico, no solo para

asegurar el cálculo correcto de la dosis de los agentes, sino también para acompañar la pérdida de peso que inevitablemente ocurre en el período posquirúrgico. En el caso de pérdida del 10% al 15% del peso corporal del animal en pocos días, se recomienda la eutanasia, también indicada cuando la pérdida total alcanza el 20% del peso corporal. La evaluación del estado corporal es una buena manera de evaluar las condiciones de salud del animal en el período posquirúrgico y en otras situaciones experimentales al definir el punto final. Para realizar esta evaluación, se debe tomar el ratón o la rata y colocarlo encima de la tapa de la jaula. Al pasar los dedos por los huesos de la pelvis (cadera), la condición de su cuerpo se puede evaluar en una escala del 1 al 5.

Descripción de los valores referentes a la evaluación:

5: El animal es obeso y no se pueden palpar los huesos

4: El animal está por encima de las condiciones normales y los huesos se sienten poco

3: El animal está en excelentes condiciones. Los huesos son palpables, pero no prominentes

2: El animal se adelgaza y los huesos son prominentes. Esta categoría se divide en +2, 2 y -2, siendo recomendada la eutanasia en este último caso (-2)

1: La pérdida de masa muscular es avanzada, no hay depósito de grasa y los huesos son muy prominentes. La eutanasia es obligatoria en este caso.

### 11.3 Durante el procedimiento

Durante el procedimiento experimental, se deben tomar en cuenta las siguientes precauciones

- Mantener la esterilidad del ambiente;
- Manipule el tejido con cuidado porque de ese modo se reduce el dolor después de realizar el procedimiento quirúrgico, y el riesgo de infección;
- Restablecer la pérdida de líquido (administrar el líquido calentado para evitar una caída repentina de la temperatura del animal - Tabla 2)
- Mantenga al animal caliente (usando placas calientes, bolsas térmicas etc.) ya que, al igual que el cuerpo pequeño, pierde calor más fácilmente. También se debe prestar atención a garantizar que el animal no desarrolle hipertermia.
- Evitar el secado de los ojos de un contacto excesivo con el aire mediante la aplicación de un gel / ungüento es escudo es ril por durante t ánodo en el que se anestesia el animal.

Tabla 2. Volúmenes aproximados para fluido terapia en ratas y ratones

Especies / Vía	Subcutánea (mL)	Intraperitoneal (mL)
Ratas (200 g)	5	5
Ratones (30 g)	1-2	2

Fuente: Adaptado de Flecknell.

#### 11.4 Cuidado posterior al procedimiento

Al final del procedimiento, es necesario un seguimiento para un adecuado apoyo postoperatorio de los animales: Mantener a los animales separados en recuperación, en cajas con una toalla de papel esterilizada en lugar de virutas, ya que esta puede adherirse a la herida quirúrgica o la nariz y la boca del animal; las jaulas deben estar expuestas a poca luz, evitando el estrés del animal; buscar mantener caliente el animal.

Las ratas y los ratones son especies bastante susceptibles a hipotermia. La temperatura del ambiente debe variar de 27 ° C a 30 ° C para los adultos y de 35 ° C a 37 ° C para los recién nacidos hasta que se restablezcan los parámetros normales, los animales no deben ser regresados a la habitación antes de asegurarse de que todos se habían recuperado de la anestesia.

Monitoree a los animales durante aproximadamente una semana para detectar signos de enfermedad e infección. Entre los signos de infección se encuentran enrojecimiento, hinchazón, presencia de secreciones, dolor y pérdida de puntos con apertura de la incisión; Los animales son monitoreados al menos una vez al día para evaluar la presencia de el dolor; Tengamos en cuenta que después de la cirugía, puede presentarse la disminución de los animales a la voluntad de consumo de agua. Esto se puede resolver mediante facilitar su acceso a los alimentos y agua. A medida aumente la ingesta el beberá agua.

La administración de fluido estéril y calentado por vía subcutánea es un medio para mejorar la recuperación del animal. La solución salina o glucofisiológica se puede utilizar por vía oral, subcutánea o intraperitoneal. Si el animal tarda en volver de la anestesia, se recomienda volver a aplicar ungüento oftálmico, para evitar la sequedad de ojos. Finalmente, siempre se debe considerar el control del dolor mediante la administración de analgésicos.

#### 11.5 Medicación pre-anestésica

Antes del procedimiento anestésico, es posible administrar un medicamento pre anestésico (MPA). Este método consiste en aplicar cualquier medicamento en un período anterior a la anestesia con el fin de aumentar la seguridad y calidad del acto anestésico. Esto se aplica a todas las especies animales, pero su uso es más común en especies más grandes. Este procedimiento proporciona analgesia y sedación, reduce el estrés antes de la anestesia, proporciona una mejor inducción anestésica, minimiza cualquier efecto indeseable durante el procedimiento, como aumento de la salivación y secreciones bronquiales, potencia el efecto del agente, disminuye la dosis de anestésico y permite una mejor y más rápida recuperación del animal. En el caso de procedimientos menos invasivos, no es necesaria la anestesia general, siendo posible utilizar solo sedantes o tranquilizantes.

Las tablas 3y4 muestran algunos ejemplos de agentes y sus dosis y efectos esperados.

Tabla 3. Agentes pre anestésicos en ratas

<b>Droga</b>	<b>Dosis</b>	<b>Observaciones</b>
Acepromazina	2,5 mg/kg IM/IP	Sedación
Atropina	0,05 mg/kg IP/SC	Parasipatótico
Diazepan	2,5-5,0 mg/kg IM/IP	Sedación
Cetamina	50-100 mg/kg IM/IP	Sedación/inmovilización
Medetomidine	0,03-0,1 mg/kg IP/SC.	Sedación/analgesia leve
Midazolan	5 mg/kg IP	Sedación
Xilazina	1-5 mg/kg IM/IP.	Sedación/analgesia leve

Fuente: Adaptado de Sharp<sup>41</sup>. Legenda: IM – intramuscular, IP – intraperitoneal, SC – subcutánea

Tabla 4 Agentes pre anestésicos en ratones

<b>Droga</b>	<b>Dosis</b>	<b>Observaciones</b>
Acepromazina	2,5 mg/kg IP/SC	Sedación leve
Atropina	0,04 mg/kg SC	Anticolinérgico
Diazepan	5,0 mg/kg IM/IP	Sedación leve
Cetamina	100-200 mg/kg IM	Sedación profunda Analgesia leve a moderada
Medetomidine	30-100 µ g/kg IP/SC.	Sedación y analgesia leve a moderada
Midazolan	5 mg/kg IP/IM	Sedación leve a moderada
Xilazina	5-10 mg/kg IP	Sedación leve/analgesia leve a moderada

Fuente: Adaptado de Flecknell. Legenda: IM – intramuscular; IP – intraperitoneal; SC – subcutanea.

## 12. Anestesia

El uso de anestésicos en ratas y ratones de laboratorio tiene como finalidad asegurar una contención química humana y prevenir el dolor, obteniendo una adecuada relajación muscular y analgesia para la realización de los diferentes procedimientos experimentales. Así, la anestesia debe realizarse, en animales de laboratorio, siempre que el procedimiento les cause dolor o malestar. Para minimizar el dolor y la incomodidad, se deben utilizar fármacos anestésicos,

analgésicos, tranquilizantes y eutanasia. El plan anestésico a inducir depende del procedimiento y de la necesidad de suprimir el dolor percibido por el animal. Así, en procedimientos menos invasivos, que incluyen la administración de fluidos, inmunización, medicación oral, solo es suficiente la contención del animal, realizada por una persona entrenada y experimentada, o, si es necesario, anestesia local. En el caso de un procedimiento más invasivo (cirugías, agentes que implican excesiva inflamación y necrosis, así como extracción de sangre por punción cardíaca, aorta retroorbital y abdominal), es necesario suprimir por completo la percepción de estímulos dolorosos mediante analgésicos y anestésicos. Para obtener los diferentes planes de anestesia, existen diferentes técnicas, utilizando uno o más agentes anestésicos, las técnicas más utilizadas son la anestesia inyectable disociativa con ketamina asociada a xilacina y la anestesia inhalada con isoflurano. Entre ellas, la inhalación se considera la técnica más segura, ya que tiene un mayor margen de seguridad y proporciona un plan quirúrgico de anestesia más estable.

Para verificar la profundidad de la anestesia, el investigador debe evaluar la presencia o ausencia de ciertos signos, como el reflejo de la cola, el reflejo palpebral y corneal y los cambios en la frecuencia cardíaca y respiratoria, que se modifican de acuerdo con los planes anestésicos alcanzados (profundidad anestesia). La respiración del animal debe ser profunda y uniforme. Si hay un reflejo presente, es decir, si el animal responde a los estímulos, la anestesia no está en el plano anestésico adecuado para la intervención quirúrgica. La anestesia general inyectable es un procedimiento más delicado, ya que provoca importantes variaciones fisiológicas en el animal, haciendo que la inducción y recuperación de la anestesia sea lenta y con largos periodos de efectos residuales de los fármacos en el organismo del animal.

### 12.1 Anestesia inyectable

En el caso de ratas y ratones, la vía más utilizada para la anestesia inyectable es la intraperitoneal, ya que la vía intravenosa es de difícil acceso en estas especies debido a su tamaño. Sin embargo, con el uso de esta vía, no es posible administrar el anestésico gradualmente como en el acceso intravenoso. Por tanto, cuando se utiliza esta vía, se administra una dosis única superior, calculada previamente. Dado que las variaciones entre linajes e incluso entre géneros dan como resultado diferentes respuestas a los anestésicos, se recomienda elegir agentes o una combinación de agentes que tengan un mayor margen de seguridad. Cuando la anestesia a utilizar es inyectable, hay algunos factores a considerar, como el lugar de administración, el método, el volumen, si el compuesto es irritante y la necesidad de dilución. La ketamina es un anestésico inyectable que induce un estado de anestesia disociativa. En la anestesia disociativa se produce una disociación con la corteza cerebral, en la que el animal se encuentra en un estado de analgesia y “parada” sin perder, sin embargo, los reflejos protectores. Los efectos esperados de la administración de ketamina en ratas y ratones incluyen: inmovilidad con aumento del tono muscular; estabilidad de la función respiratoria; analgesia variable, pero no apta para cirugía en ratones; estimulación de parámetros cardiovasculares; aumento del flujo sanguíneo cerebral; aumento de la presión intracraneal; y aumento de la presión intraocular. El agente utilizado solo no produce un efecto anestésico adecuado en ratas y ratones. Para relajar los músculos debido al aumento del tono muscular y aumentar la duración de la anestesia, se puede utilizar ketamina asociada a agentes

sedantes, como diazepam o acepromazina. En este caso, la analgesia generada es leve, no suficiente para un procedimiento quirúrgico, pero adecuada para procedimientos menos invasivos y dolorosos.

Si es necesario obtener un plan anestésico moderado para realizar procedimientos relativamente dolorosos, la ketamina se puede combinar con un agonista alfa-2 como la xilacina. Estos fármacos promueven una mejor analgesia y relajación muscular, pero provocan hipotermia grave y depresión cardiovascular y respiratoria. Dichos efectos pueden revertirse con el uso de agentes antagonistas, sin embargo, con su aplicación, también se pierde la analgesia y relajación muscular obtenidas.

El uso de agentes antagonistas ocurre cuando el animal parece tener una reacción adversa al agente, si ha recibido una dosis muy grande de anestésico o cuando el procedimiento ya se ha completado. Anestesia inyectable, es común usar la combinación de más de un agente.

### 12.2 Anestesia por inhalación

El uso de anestesia inhalatoria depende de equipos específicos y formación técnica, pero es el método más apropiado para realizar procedimientos quirúrgicos, incluidos los procedimientos a largo plazo en ratas y ratones.

Durante la administración de la anestesia por inhalación, se debe observar el estado de salud del animal, especialmente si el animal no parece tener ninguna enfermedad en el tracto respiratorio que pueda interferir con la administración del agente. La inducción del animal para la anestesia por inhalación se realiza colocándolo dentro de una cámara de inducción. Esta cámara recibe el agente anestésico por inhalación en la concentración adecuada con oxígeno gaseoso a través del dispositivo de anestesia por inhalación. Tan pronto como el animal está anestesiado, se saca de la cámara y se mantiene la anestesia mediante una mascarilla proporcional a su tamaño y adecuada a la especie que se utilice. Es importante administrar al animal el agente analgésico elegido antes del procedimiento, ya que el retorno del animal de la anestesia es casi inmediato cuando se retira la máscara. Para cirugías mayores, también es posible combinar anestesia inyectable con inhalación. Entre las ventajas y desventajas de usar este agente, cabe mencionar las siguientes:

Ventajas: rápida inducción y recuperación de la anestesia; tiene efectos menores sobre los parámetros cardiovasculares en comparación con el halotano, otro agente anestésico inhalado; buena relajación muscular.

Desventajas: alto costo; como es un gas, es necesario utilizarlo dentro de una capilla, por la seguridad del operador; aumento de secreciones en las vías respiratorias; necesita un control más delicado, ya que puede cambiar rápidamente el plan anestésico y provocar una sobredosis. Al final de la anestesia prolongada, se recomienda administrar al animal oxígeno puro durante aproximadamente 5 a 10 minutos, para evitar la hipoxia.

### 13. Dolor

En el pasado se creía que los animales no podían sentir dolor. Hoy en día, se sabe que sienten dolor, pero es difícil reconocer ese dolor y saber el grado de dolor que siente el animal está sintiendo. Esta dificultad se basa en que los animales no tienen la capacidad de decirnos lo que sienten y que, a través de un mecanismo instintivo de supervivencia, esconden el dolor para no ser presa vulnerables. Salvo en estudios justificados sobre investigación del dolor, en otros procedimientos y estudios, el dolor siempre debe minimizarse. Su causa debe identificarse y eliminarse / aliviarse con el uso de analgésicos. La mejora en el manejo y acomodación y la observación constante del animal para la reevaluación del dolor complementan el manejo del dolor, junto con el uso de analgésicos. En ratas y ratones, los signos indicativos de dolor implican cambios en el comportamiento normal de la especie, como postura arqueada, vocalización al manipularlos, piloerección y pérdida de peso. La Tabla 5 muestra los signos indicativos de dolor en ratas, ratones.

Tabla 5.

Señales	Ratas	Ratones
Disminución de consumo de agua	x	x
Pérdida de peso	x	x
Aislamiento social	x	x
Automutilación , mordedura de miembros	x	x
Respiración acelerada	x	x
Respiración con boca abierta	x	x
Respiración abdominal	x	x
Mordidas y acreción		x
Aumento o disminución de movimientos	x	x
Apariencia de pelaje	x	x
Postura anormal	x	x
Lagrimo,porfirina,		x
Pupilas dilatadas		x
Rígiditas muscular, falta de tono muscular	x	x
Deshidratación ,ojos hundidos	x	x
Espasmos, temblores	x	x
Enrojecimiento , hinchazón o ardor de la herida quirúrgica	x	x

#### 14. Estrés

El estrés se definió como el efecto de factores físicos, fisiológicos o emocionales que inducen un cambio en la homeostasis del animal. La homeostasis es el equilibrio fisiológico normal del cuerpo. Para la evaluación del estrés, se deben utilizar preferiblemente métodos no invasivos. Los parámetros utilizados en la evaluación del estrés incluyen cambios de comportamiento, síntomas clínicos, aspectos fisiológicos, indicadores bioquímicos, hallazgos patológicos e indicadores inmunológicos. Cabe mencionar que, a la hora de evaluar el estrés, es preferible utilizar siempre más de uno de estos parámetros.

#### 15. Analgesia

Para garantizar el bienestar animal después del procedimiento quirúrgico, el investigador debe evaluar en su protocolo la posibilidad de utilizar un agente analgésico. Siempre se debe considerar el uso de analgésicos cuando se realizan procedimientos quirúrgicos invasivos, para aliviar el dolor postoperatorio inmediato y a largo plazo. Para poder manejar adecuadamente el dolor y el estrés del animal, es necesario conocer el comportamiento normal de la especie y el comportamiento relacionado con el dolor. El reconocimiento del dolor en los animales es difícil; por lo tanto, en caso de duda, debe considerarse que si el procedimiento puede causar dolor en humanos, también puede causar dolor en animales. Por lo tanto, es necesario pensar en formas de aliviar el dolor. Dentro del alcance de la investigación, es ventajoso promover el alivio del dolor, ya que el animal con dolor sufre cambios fisiopatológicos que pueden influir en los resultados de los experimentos. Además, a la hora de promover el alivio del dolor, se trabaja de acuerdo con la legislación y con principios éticos y humanitarios. Existen muchos agentes analgésicos disponibles para realizar los cuidados postoperatorios adecuados con el animal, considerando que existen procedimientos experimentales más invasivos que otros, provocando diferentes grados de dolor en el animal

Una de las desventajas de algunos analgésicos es que deben administrarse inyectables o por sonda, lo que implica un manejo excesivo del animal. Otra desventaja es que muchos agentes, para mantener el efecto analgésico esperado, deben administrarse frecuentemente en períodos cortos. Lo ideal sería utilizar un agente que se pueda administrar en el agua, para evitar el mayor estrés del animal por manipulación excesiva. Sin embargo, cabe señalar que los animales en el período posquirúrgico tendrán una ingesta reducida de agua y el analgésico administrado en el agua puede no lograr el efecto deseado. También existe la posibilidad de añadir un analgésico de larga duración al protocolo de medicación pre anestésica. Las tablas 6 y 7 muestran los principios activos y las dosis de los fármacos analgésicos indicados para ratas y ratones de laboratorio, para ser administrados siempre que exista la posibilidad de dolor debido al procedimiento experimental. Es importante enfatizar que no basta con administrar un analgésico; es necesario reevaluar el estado del animal para confirmar que el dolor ha sido controlado.

Tabla 6. Agentes analgésicos recomendados para ratas

Categoría	Agente	Dosis	Duración de la analgesia	Indicación
Opioides	Buprenorfina	0,02-0,5 mg/kg SC/IV/IP	6-12 h	Dolor moderado a intenso
Opioides	Butorfanol	0,2-2 mg/kg SC/IP	2-4 h	Dolor moderado a intenso
Opioides	Meperidina	10-20 mg/kg SC/IM	2-3 h	Dolor moderado a intenso
Opioides	Morfina	2-5 mg/kg SC	2-4 h	Dolor moderado a intenso
AINES	Aspirina (ácido acetilsalicílico)	100 mg/kg VO	4-8 h	Dolor leve a moderado
AINES	Flunixin meglumine	1,1-2,5 mg/kg SC/IM	12 h	Dolor leve a moderado
AINES	Carprofeno	1,5 mg/kg VO	12 h	Dolor leve a moderado
AINES	Ibuprofeno	10-30 mg/kg VO	4 h	Dolor leve a moderado
AINES	Acetaminofén (paracetamol)	1-2 mg/mL en agua		Dolor leve a moderado
AINES	Cetoprofeno	5 mg/kg VO/IM	24 h	Dolor leve a moderado

Fuente: Adaptado de Ness. Abreviatura: IM – intramuscular; IP – intraperitoneal; SC – subcutánea; IV – intravenosa; VO – vía oral.

Tabla 7. Agentes analgésicos recomendados para ratón

Categoría	Agente	Dosis	Duración de la Analgesia	Indicación
Opioides	Buprenorfina	0,05-2,5 mg/kg SC/IP	6-12 h	Dolor moderada a severa
Opioides	Butorfanol	0,2-2 mg/kg SC/IP	2-4 h	Dolor moderada a severo
Opioides	Meperidina	10-20 mg/kg SC/IM	2-3 h	Dolor moderada a severo
Opioides	Morfina	2-5 mg/kg SC	2-4 h	Dolor moderado a severo
AINES	Aspirina (ácido acetilsalicílico)	120 mg/kg VO	4 h	Dolor leve a moderado
AINES	Flunixin Meglumine	0,3-2 mg/kg VO/IM/IV	12-24 h	Dolor leve a moderado
AINES	Carprofeno	5 mg/kg SC	24 h	Dolor leve a moderado
AINES	Ibuprofeno	7-15 mg/kg VO	4 h	Dolor leve a moderado
AINES	Acetaminofén (paracetamol)	1-2 mg/mL en agua		Dolor leve a moderado

Fuente: Adaptado de Ness. Abreviatura: IM – intramuscular; IP – intraperitoneal; SC – subcutánea; IV – intravenosa; VO – vía oral

## 16. Eutanasia

El término eutanasia se deriva del griego (eu = bueno, thanatos = muerte) y significa "buena muerte", es decir, una muerte sin sufrimiento. Una "buena muerte" es aquella en la que el animal no siente dolor ni angustia. En la realización de experimentos científicos con animales, la eutanasia es necesaria al final del experimento o en los siguientes eventos: amenaza para el bienestar animal; incapacidad para usar medicamentos para aliviar la angustia o el sufrimiento; o incluso cuando el animal represente una amenaza para la salud pública o animal; o es objeto de enseñanza. La mayoría de las veces, la recolección de material biológico de los animales para su análisis ocurre antes o después de la eutanasia. Como los investigadores son responsables de la eutanasia del animal en experimentación, es tu deber velar por que sean tratados en todo momento con el mayor respeto, evitando que tengan una muerte dolorosa y sean llevados con angustia en los momentos previos a la muerte, antes de perder el conocimiento. Las técnicas de eutanasia deben producir una pérdida rápida del conocimiento, seguida de un paro cardíaco o respiratorio y la pérdida permanente de la función cerebral. Además de cuidar el bienestar del animal, se deben tener en cuenta los efectos emocionales que le causan al operador. Las reacciones implican dolor por la pérdida de una vida, malestar, angustia y malestar. Se deben buscar soluciones para paliar este problema, como la rotación de personal, la formación de investigadores y personal técnico en métodos humanitarios de gestión y eutanasia y los efectos esperados del método utilizado, así como la razón por la que se está llevando a cabo la

eutanasia. Si es necesario, se debe realizar un seguimiento psicológico de los involucrados, ya que la eutanasia de un animal puede hacer que la persona entre en conflicto con sus principios éticos y morales. Independientemente de las circunstancias, el método de eutanasia siempre debe seleccionarse en base a principios éticos y valores sociales y morales. Este tema siempre debe ser revisado y estudiado, a fin de buscar las mejores técnicas y equipos para realizar este procedimiento de manera eficiente y humana (Tabla 8).

Tabla 8. Criterios para un método humanitario de eutanasia

Ausencia de signos de miedo, dolor o angustia
Período de tiempo mínimo para que el animal esté inconsciente
El método debe ser fiable y reproducible
El método debe ser seguro para el personal involucrado
Debe causar efectos psicológicos y fisiológicos mínimos en el animal
Debe ser compatible con las necesidades de la investigación
No debe causar efectos emocionales al operador, ni causar efectos adversos mínimos
Debe tener un impacto mínimo en el medio ambiente
El mantenimiento de los equipos usados debe ser fácil y periódico
Debe llevarse a cabo lejos de las habitaciones de animales
El operador deberá tener experiencia en la correcta contención y gestión de los animales

## 17. Nutrición

El estado nutricional del animal de laboratorio influye en su capacidad para alcanzar su potencial genético de crecimiento, longevidad, reproducción, así como en su respuesta a patógenos y otros tipos de estrés ambiental. Una dieta equilibrada, con una formulación conocida y reproducible, garantiza no solo el bienestar de los animales, sino también la calidad de los resultados de los experimentos realizados con estos animales. La dieta de los animales de laboratorio debe tener unos 50 nutrientes en concentración adecuada, que satisfagan las necesidades nutricionales del animal, además de estar libre de sustancias tóxicas o microorganismos patógenos. Las formulaciones de las dietas se clasifican según el grado de refinamiento de sus ingredientes, en dietas químicamente definidas o puras, dietas purificadas y dietas con ingredientes naturales. La dieta químicamente definida se formula directamente a partir de nutrientes esenciales, como aminoácidos, ésteres de ácidos grasos, glucosa, vitaminas y minerales.

Tabla 9

Componente	Cantidad (producto expres. s/kg)
Proteína bruta	20% (mín.) a 23% (máx.)
Lípidos (extracto de éter)	4% (mín.) a 5% (máx.)
Fibra total (materia fibrosa)	5% (mín.) a 8% (máx.)
Humedad	Máxima 12,5%
Hierro	50 mg/kg (mín.) a 300 mg/kg (máx.)
Zinc	30 mg/kg (mín.) a 130 mg/kg (máx.)
Cobre	6 mg/kg (mín.) a 20 mg/kg (máx.)
Calcio	Máximo entre 1,3% e 1,4%
Fósforo	Mínimo entre 0,5% e 0,8%
Vitamina A	Mínimo de 12.000 UI/kg
Aditivos	Antioxidantes 100,00 mg

## 18. Sistema de Apareamiento

### 18.1 Sistema de apareamiento para la colonia de fundación:

- a. Debe mantenerse solo con apareamiento entre hermano y hermana
- b. Utilice el sistema monógamo intensivo
- c. Mantener un número de cinco a diez parejas fundadoras
- d. Después de seis meses de la fecha de apareamiento, las parejas deben renovarse
- e. Reservar los cachorros de la pareja que presenten el mejor desempeño reproductivo para la perpetuación del linaje. Estos serán los futuros criadores de la colonia de la fundación.

### 18.2 Sistema de apareamiento para la colonia de expansión:

- a. Debe mantenerse mediante el apareamiento entre hermanos o primos
- b. Utilice el sistema de polígamo intensivo
- c. Mantener un número suficiente de criadores para abastecer los animales solicitados en el semestre.
- d. Después de seis meses de la fecha de apareamiento, las parejas deben renovarse

### 18.3 Procedimiento de apareamiento:

- a. Separar el material necesario para el apareamiento (cajas, rejillas, hojas de registro)
- b. Realizar el apareamiento en la proporción de una hembra a un macho en la colonia de fundación y en la proporción de un macho a dos hembras en la colonia de expansión

- c. Coloque primero al macho en la jaula
- d. Coloque la (s) hembra (s) en la jaula con el macho;
- e. Registrar en el formulario de identificación de cada jaula: tipo de colonia, linaje, fecha de nacimiento de macho y hembra, fecha de apareamiento, proporción de hembras por macho
- f. Registrar en el mapa genético el número de parejas formadas siguiendo la secuencia de generaciones.

#### 18.4 Destete de cachorros:

- a. Destete a los cachorros de cada pareja por separado
- b. Coloque machos y hembras en jaulas separadas
- c. Mantenga siempre el número de animales por jaula recomendado para la especie
- d. Registrar en el archivo de la pareja el número de animales de cada sexo destetados y la fecha de destete
- e. Colocar un formulario de registro para cada jaula con los datos: linaje, fecha de nacimiento, fecha de destete, número de animales, sexo y número de padres
- f. Realice el mismo procedimiento para todas las parejas que tengan cachorros destetados.

#### 18.5 Sistema de apareamiento para la colonia de fundación:

- a. La colonia de fundación debe mantenerse únicamente mediante el apareamiento entre individuos no emparentados
- b. Utilizar el sistema descrito por Poiley (1960), que distribuye parejas en grupos y, así, se realizan apareamientos entre individuos de distintos grupos
- c. Utilice el sistema de apareamiento monógamo intensivo: Debe haber un mínimo de 25 parejas divididas en un mínimo de 5 grupos
- d. Mantener juntas a las parejas hasta el final de la vida reproductiva
- e. Después de seis meses de la fecha de apareamiento, las parejas deben renovarse;
- f. Reserve los cachorros de todas las parejas para la perpetuación del linaje. Estos serán los futuros criadores de la colonia de la fundación.

#### 18.7 Sistema Poiley

Grupo que viene Grupo que forma Hombres Mujeres BCACDBDECEADAB

Procedimiento de apareamiento:

- a. Separar el material necesario para el apareamiento (cajas, rejillas, hojas de registro)
- b. Realizar el apareamiento en la proporción de una hembra a un macho

- c. Coloque primero al macho en la jaula
- d. Coloque a la hembra en la jaula con el macho
- e. Registrar, en la hoja de identificación de cada jaula, el tipo de colonia, el linaje, la fecha de nacimiento de machos y hembras, la fecha de apareamiento, la proporción de hembras por macho y la generación
- f. Después de seis meses de la fecha de apareamiento, las parejas deben renovarse.

**Tabla 10.** Desarrollo de cría de Ratas y Ratones

Edad (días)	Ratón	Rata
Nacimiento	Ojos cerrados, color rojo sangre, presencia de leche en el estómago, vibrissas, orejas cerradas. Para los animales negros, el color es oscuro, y los machos tienen una mancha oscura entre el ano y el aparato genital	Ojos cerrados, color rojo sangre, presencia de leche en el estómago, vibrissas, orejas cerradas. Para los animales negros, el color es oscuro
1	Piel rosada, leche en el estómago, ojos y oídos cerrados	Piel rosada, leche en el estómago, ojos y oídos cerrados
2	Piel rosa claro, ojos y oídos cerrados. Los animales negros tienen la piel rosada, con un tinte más oscuro en la espalda	Piel rosa claro, ojos y oídos cerrados. Los animales negros tienen la piel rosada, con un tinte más oscuro en la espalda
3	Las orejas comienzan a despegar de la cabeza	Las orejas comienzan a despegar de la cabeza
4	La mitad de la oreja está cortada de la cabeza	La mitad de la oreja está cortada de la cabeza
5	Los animales albinos no tienen color y los animales negros tienen un color más definido	Los animales albinos no tienen color y los animales negros tienen un color más definido
6	El cabello empieza a nacer como un down on the back	El cabello empieza a nacer como un down on the back
7	Presencia de capa fina en mayor cantidad en la región dorsal	Presencia de capa fina en mayor cantidad en la región dorsal
8	Los senos comienzan a ser visibles en las hembras de ratones albinos, mientras que en los ratones negros los pechos siguen siendo invisibles	Los senos aún no se pueden ver
9	Los más cerrados en la parte de atrás. Pechos visibles en ratones de color oscuro	Los dientes incisivos inferiores visibles y los incisivos superiores comienzan a apuntar
10	Incisivos inferior visible	Incisivos inferior visible después de 90 días
11	Dientes incisivos superiores pueden ser visualizados	Las mamas se hacen visibles
12	Las orejas se abren totalmente	Las orejas se abren totalmente
12-14	Comienzan a consumir alimentos sólidos, pero la lactancia materna sigue siendo la principal fuente de	Comienzan a consumir alimentos sólidos, pero la lactancia materna sigue siendo la principal fuente de

	alimentos	alimentos
13-14	Inicia abertura de los ojos	Inicia abertura de los ojos



Figura 23. Perfil de desarrollo de ratón. Datos no publicados y obtenidos en el Bioterio FCF-IQ/USP



Figura 24. Perfil de desarrollo de ratas datos obtenidos en el Bioterio FCF-IQ/USP

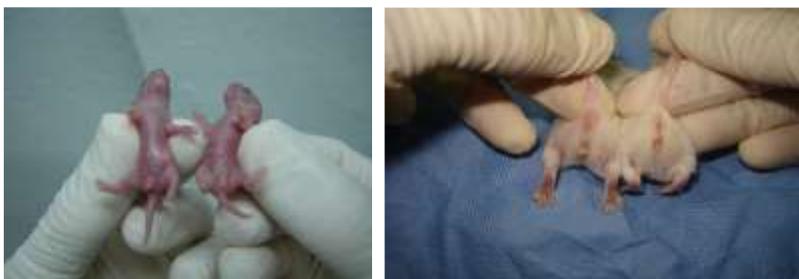


Figura 25. A) Neonatos de ratones con un día de vida: macho a la izquierda y hembra a la derecha; B) Ratones recién destetados. : macho a la izquierda y hembra a la derecha

## Capítulo II

### Guía de cuidados y procedimientos en el laboratorio de Bioterio

#### 1. Adquisición de animales de Laboratorio

Los animales con las que se iniciaran las cruzas son aportados del laboratorio de Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas de Universidad Nacional de Asunción.

**Tabla 1.** Taxonomía de ratas y ratones

	<b>Rata</b>	<b>Ratón</b>
<b>Clase</b>	Mamífera	Mamífera
<b>Orden</b>	<i>Rodentia</i>	<i>Rodentia</i>
<b>Familia</b>	<i>Muridae</i>	<i>Muridae</i>
<b>Genero</b>	<i>Rattus</i>	<i>Mus</i>
<b>Especie</b>	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Mus musculus</i>

**Tabla 2.** Parametros biológicos, fisiológicos e reproductivos

<b>Parametros</b>	<b>Rata</b>	<b>Ratón</b>
Número de cromosomas	42 (diploides)	40 (diploides)
Temperatura corporal	36-37,5 °C	35,2-37,9 °C
Fórmula dentaria	2 (1/1 I, 0/0 C, 0/0 PM) e 3/3 M)=16	2 (1/1 I, 0/0 C, 0/0 PM) e 3/3 M)=16
Inicio do consumo de alimento sólido	14 días	12 días
Peso al nacer	6-7 g	1-2 g
Peso al destete	45-60 g	10-15 g
Peso adulto (macho)	350-500 g	25-50 g
Peso adulto (hembra)	250-350 g	25-45 g
Adulto joven ( Edad)	8 semanas	6 semanas
Edad Reproductiva	8-10 semanas	6-8 semanas
Final de edad reproductiva	10-12 meses	8-10 meses
Ciclo estral	4-5 días	4-5 días
Duración de Estro	12 horas	10-20 horas
Mecanismo de ovulación	Espontanea	Espontanea
Período de gestación	20-22 días	19-21 días
Edad de destete	21 días	19-28 días
Mamas	6 pares	5 pares

## 2. Normas de seguridad y protección del personal

El personal debe adoptar normas y formas de protección, para brindar buenas condiciones de mantenimiento y salud a los ratones.

Para ello deberá contar con procedimientos e instrucciones normalizados como:

- Procedimiento de higiene de personal.
- Procedimiento de ingreso al Bioterio de producción o Bioterio de experimentación.
- Procedimientos de limpieza de ambientes, con programas de limpieza y rotación de desinfectantes, efectivo.
- Procedimientos de limpieza y desinfección de materiales.
- Procedimiento de eliminación de desechos.
- Programa de control de plagas.
- Programa de capacitación al personal.
- Flujo de personal y materiales por las zonas indicadas, para evitar diseminación de material contaminado en zonas limpias.

## 3. Evaluación médica y medicina preventiva para el personal

Se recomienda elaborar una historia clínica y la realización de evaluaciones médicas periódicas, debiendo implementarse un plan de inmunización contra el tétano, para personal que cuida de los animales.

Se deberá conocer de problemas respiratorios (asma), neurológicos o alergias de los empleados, serán informados por escrito a los jefes inmediatos.

Asimismo, deberá realizarse vigilancia microbiológica, como análisis nasofaríngeos y análisis de heces (dos veces por año).

## 4. Seguridad e Identificación de Peligros

El personal debe identificar y evaluar los peligros y riesgos que son propios cuando se trabaja con ratones (mordidas, alérgenos y zoonosis) y de los materiales utilizados en el Bioterio de producción (agentes químicos de limpieza y biológicos peligrosos) en la intensidad de la exposición, su duración y frecuencia de uso.

El uso de los elementos de protección del personal (mascarilla, guantes, gorros, etc.), los procedimientos normalizados de limpieza y desinfección de materiales e instalaciones conjuntamente con los flujos adecuados de personal y material, constituyen una verdadera barrera sanitaria, que se recomienda mantenerla vigente a pesar de las limitaciones en equipamiento e infraestructura.

Informar inmediatamente al jefe o coordinador, cualquier accidente.

Tener conocimiento de la localización del botiquín de primeros auxilios y rutas de evacuación ante una emergencia

## 5. Higiene del personal

El personal debe mantenerse limpio, utilizando ropa apropiada dentro de los ambientes del Bioterio de producción o de experimentación, deberá lavarse las manos y cambiarse de ropa con la frecuencia necesaria para mantener la higiene personal. Esta ropa no debe utilizarse fuera de las instalaciones. Utilizar guantes quirúrgicos para el manejo de los animales.

En los Bioterio el personal no debe beber, fumar o aplicarse cosmético.

No llevar nada a la boca mientras se esté en el Bioterio

El investigador podrá decidir, de acuerdo con sus necesidades, dónde ubicar a los animales empleados, teniendo en cuenta que el lugar brinde las condiciones ambientales y de manejo óptimos que aseguren la salud y la comodidad de especímenes, de modo que sus patrones metabólicos y de comportamiento se mantengan normales y estables, dando respuestas confiables.

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

- Climáticos: temperatura, humedad, ventilación, etc.
- Físicoquímicos: iluminación, ruido, composición del aire, sanitizantes, lecho o cama, etc.
- Habitacionales: forma, tamaño, tipo y población de las jaulas, etc.
- Nutricionales: dieta, agua, esquema de administración.
- Microorganismos y parásitos.
- Situación experimental.

## 6. Microambiente

El microambiente, es el ambiente físico inmediato que rodea al ratón, también llamado confinamiento o encierro primario, esta limitado por el perímetro de la jaula o caja, cama, alimento y agua de bebida; deben contribuir a la salud de los animales, y evitarles todo estrés, por lo que deberá asignársele, a cada uno, un espacio adecuado que le permita movimientos y adopciones de posturas normales, preservando a su vez las mínimas condiciones de higiene y de protección contra insectos, roedores y otras plagas.

El microambiente lo conforman la caja o jaula, el alimento, el agua, así como el mantenimiento de las condiciones de higiene de cada uno de ellos. Primeramente definiremos las condiciones de las cajas o jaulas.

### 6.1 Caja o jaula

Los ratones se alojan en cajas o jaulas especialmente diseñadas para facilitar su bienestar, pueden ser de metal o de plástico (polipropileno, policarbonato, poli estireno y polysulfano), provistas de tapas de acero inoxidable con o sin filtro.

El poliestireno es transparente y resiste al auto clavado y a la mayoría de desinfectantes. El poli estireno y el polipropileno no resisten temperatura elevadas.

La altura de las paredes de la caja no debe ser menor de 12,7 cm.

Debe tener las siguientes características:

- Proporcionar espacio adecuado, ser cerrado, seguro y protegerlo de las amenazas externas.
- Ser adecuado en ventilación.

- Ser resistente al lavado, desinfección y esterilización frecuente.
- Permitir la observación del animal.
- Tener pisos y paredes fáciles de limpiar (superficies lisa) y con tapa removible de rejas o perforada.
- Mantenerse en buenas condiciones de uso.
- Facilitar el acceso de los animales al agua y alimento.
- No presentar bordes cortantes o proyecciones que puedan causar lesiones.

## 6.2. Recomendaciones de espacio

El número de animales por jaula estará en relación con el tamaño corporal (edad del ratón, estado pre y postnatal) evitándose la sobrecarga.

El tamaño de las jaulas o cajas debe ser apropiado; por ejemplo, en el caso de ratones adultos, se requiere una superficie mínima de 80 cm<sup>2</sup> por animal.

El requerimiento mínimo es que el animal disponga de espacio suficiente para moverse y para expresar las posturas normales de conducta y sociabilidad, debe tener fácil acceso al agua y alimento y debe tener un área suficiente con material de lecho limpio y sin obstáculos para moverse y descansar.

En la siguiente tabla se muestra las recomendaciones del espacio asignado a roedores alojados en grupos; si se alojan individualmente o exceden los pesos listados, podrían requerir de más espacio, de acuerdo con el criterio profesional y de experiencia.

Espacios recomendados para ratones de laboratorio

**Tabla 3.** Espacio físico recomendado para roedores de laboratorio

Especie	Peso (g)	Área de piso/animal (cm <sup>2</sup> )	Altura (cm)
<b>Rata</b>			
< 100	109,65		45,15
Hasta 200	148,35		45,15
Hasta 300	187,05		45,15
Hasta 400	258		45,15
Hasta 500	387		45,15
> 500	≥ 451,5		45,15
<b>Ratón</b>			
< 10	38,7		32,25
Hasta 15	51,6		32,25
Hasta 25	77,4		32,25
> 25	≥ 96,75		32,25

### 6.3. Lecho o cama

Los lechos serán de material absorbente tal como la viruta de madera, la coronta molida del maíz (marlo), etc.; libres de polvillo, alérgenos y sustancias tóxicas. Deben ser esterilizarles.

La viruta más adecuada es la de de pino blanco, seguida por la de tornillo.

Se debe tener especificaciones de calidad de la viruta para su adquisición, tales como:

- No ser nocivo.
- Capacidad de absorción
- No se recomienda el uso de viruta procedente de cedro o caoba.

El material del lecho o cama seleccionado, deberá transportarse y almacenarse en sacos o envases de plástico, cerrados aislados del piso, sobre parihuelas, de modo que permita mantener la calidad y evitar la contaminación.

Tener cuidado durante la esterilización que se realiza por auto clavado, la viruta puede absorber humedad, perdiendo su absorbancia y ser susceptible al crecimiento de microorganismos, por ello debe usarse tiempos apropiados de secado y buenas condiciones de almacenamiento.

Debe usarse en cantidades suficientes para mantener a los animales secos entre cada cambio.

Se debe tener procedimientos para la eliminación de las camas potencialmente contaminadas.

Se deberá establecer procedimientos para controlar la calidad del lecho, como la determinación de contaminantes.

## 7. Microambiente

El microambiente es el espacio inmediato al microambiente y es la sala de alojamiento en su ámbito general.

La alteración de los factores del microambiente 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.

### 7.1. Aire y ventilación

Encendido y apagado automático y programado de extractor de aire, para asegurar la circulación correcta de aire dentro de las habitaciones.

La ventilación es importante para controlar la humedad, calor, gases tóxicos. Se debe generar entre 15 a 20 recambios de aire / hora.

### 7.2. Temperatura y humedad relativa

Las exigencias de temperatura para ratones son de 20 a 25 °C y la humedad relativa ambiental entre 40 y 70%.

Las condiciones ambientales en que se crían y experimentan los animales influyen decisivamente en las respuestas a los diferentes tratamientos.

Si se requiere respuestas estandarizadas, las condiciones en que se mantienen los animales deben ser fijas.

### 7.3. Intensidad de la luz y tipo de iluminación

Los ambientes de crianza deben contar con la luz artificial, provista de lámparas fluorescentes tipo luz día, con incidencia oblicua, con una iluminación máxima de 323 lux a un metro del piso; de forma tal, que todas las jaulas, independientemente de su ubicación, reciban intensidades similares de luz.

La iluminación debe distribuirse adecuadamente a través de la sala de alojamiento y ser lo suficiente para las prácticas de mantenimiento, inspección y bienestar de estos, sin causarles signos clínicos a los animales. También debe proporcionar condiciones seguras de trabajo para el personal.

La iluminación es importante para la regulación del ciclo estral y reproductivo.

Se recomienda 12 horas luz/12 horas oscuridad, lo cual se programa con un reloj temporizador.

### 7.4. Ruido

Los ratones son muy sensibles al ruido y pueden percibir frecuencias de sonido que son inaudibles para el ser humano, por lo que el personal debe tratar de minimizar la generación de ruido innecesario. El ruido excesivo e intermitente se puede minimizar capacitando al personal en modos alternativos a las prácticas que producen ruido. Los radios, celulares, alarmas y otros generadores de sonido, aun con auriculares o audífonos, no deben usarse en las salas de alojamiento de animales. Se permite un nivel máximo de ruido de 85 decibeles, si estos son mayores tiene efectos nocivos como estrés y problemas de fertilidad.

### 7.5 Olor

El olor es otro factor que afecta al ratón, 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.

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 de amoníaco.

### 8. Cuarentena

El ratón tiene que pasar por un tiempo de adaptación (cuarentena), desde su adquisición hasta su uso, con el objetivo de tener ratones menos estresados y más sanos, que proporcionen un mejor resultado experimental.

Este periodo no es menor de 15 días.

Todos los días se observaran a los ratones, para detectar cambios de comportamiento, enfermedades, heridas o muerte.

### 9. Alimentación y manejo de alimento

Los animales deben recibir alimento en cantidad y calidad suficiente para sus necesidades y para conservar la salud. El acceso al alimento debe animales se albergan en grupos, debe haber

suficientes puntos de alimentación para minimizar la competencia por el alimento y asegurar que todos los ratones tengan acceso al alimento.

El alimento se suministra diariamente; se incrementará los días que se considere necesario por razones de fuerza mayor.

Cada ingreso de alimento debe ser registrado, de tal manera que el alimento de ingreso más antiguo se use primero, nunca utilizar alimento vencido. Los sacos de alimento abiertos deben almacenarse en contenedores totalmente cerrados.

Cada lote de ingreso se debe controlar la calidad: análisis bromatológico y su carga microbiana.

El alimento debe almacenarse en cuartos o almacenes desinfectados, secos y ventilados, aislado del piso, sobre parihuelas de preferencia de plástico.

El alimento no debe ser expuesto a temperaturas por encima de 25º C, humedades relativas mayores a 60%, condiciones insalubres, luz, oxígeno, insectos y roedores, porque ello aumenta el deterioro y la contaminación.

Los contenedores de alimento no deberán movilizarse a diferentes salas y deberán lavarse y sanearse regularmente.

Si el alimento es auto clavado este requiere de una reformulación en la concentración de nutrientes, tipos de ingredientes y métodos de preparación para compensar la degradación sufrida durante la esterilización. Debe considerarse el irradiar el alimento como una opción frente al auto clavado.

Composición química de una dieta estándar

#### 10. Provisión de Agua

Debe ser renovada en forma total, diariamente o cada dos días, eliminando todo contenido residual del frasco de bebida.

Los frascos de bebida deberán ser lavados y desinfectados por lo menos una vez por semana, los picos serán observados y lavados con cepillo periódicamente para evitar el taponamiento.

Se recomienda la vigilancia microbiológica de manera periódica, para asegurar que la calidad del agua sea aceptable y no influya en los resultados experimentales ser libre y dosificado de acuerdo con los requerimientos,

Así mismo, se deberá describir el proceso de tratamiento o purificación del agua.

**Tabla 4.** Consumo de ración de Agua

	<b>Rata adulta</b>	<b>Ratón adulto</b>
<b>Agua ingerida (mL)</b>	10 a 20 mL/día	3 a 7 mL/día
<b>Racion ingerida (g)</b>	10 a 20 g/día	4 a 5 g/día

## 11. Limpieza y Sanitización

### 11.1. Eliminación de desechos

El área de eliminación de desechos debe proveer espacio para el almacenaje apropiado de material relacionado con los animales, excrementos, camas sucias, cadáveres, materiales peligrosos, etc. Los desechos colocados fuera de las instalaciones se deben mantener en recipientes cerrados herméticamente.

Se debe tener normalizado el manejo, almacenamiento, método y frecuencia de eliminación de desechos.

### 11.2. Limpieza y sanitización de áreas (alojamientos secundarios).

Los materiales y utensilios de limpieza deberán ser exclusivos de cada una de las salas y mantenerse en buenas condiciones de uso, para evitar que actúen como vectores de microorganismos. Estos materiales son: el balde, los trapeadores, los jaladores de agua, la esponja de metal, la espátula ancha, las bolsas de residuo y el detergente.

No se debe usar desinfectantes con olores fuertes y mucho menos desodorantes de ambiente. El Bioterio deberá implementar un programa de limpieza en la que se determinará la frecuencia de limpieza de las salas y los pasillos además del tipo de desinfectante por usar, señalando la metodología (manual o automático).

Se recomienda realizar la limpieza total (radical), empleando detergente para la superficie del piso, ya que este remueve y desprende toda grasa que impida la acción del desinfectante.

### 11.3. Limpieza y desinfección de materiales (alojamientos primarios)

#### 11.3.1. Limpieza y desinfección de jaulas

Cambiar el material del lecho dos a tres veces por semana.

Para evitar concentraciones altas de amoníaco que son perjudiciales para los animales, esta frecuencia también depende del tamaño, cantidad de ratones albergados y de la ventilación del ambiente.

Se recomienda tener un orden como empezar por la primera jaula de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo.

Usar ese orden para cambiar el lecho, dar la comida y el agua. De esa forma se evita que por distracción, alguna jaula quede sin cambiar o sin alimento o agua.

En cada cambio de lecho, lavar las jaulas utilizando detergente, esponja o escobilla, luego desinfectar con soluciones como:

Retire las virutas de madera, la orina y las heces de las cajas de animales Depositar los residuos en bolsas blancas identificadas con el símbolo de riesgo biológico. Selle las bolsas.

#### 11.3.2. Limpieza y desinfección de frascos bebederos

Los frascos bebederos serán lavados y desinfectados cada vez que se suministre agua de bebida.

Se lavarán con agua, escobilla y detergente toda la superficie interna del frasco, igual proceder con los goteros para lo cual se usa un cepillo especial. Luego, desinfectar con agua caliente o con algún desinfectante como hipoclorito de sodio sumergiendo el bebedero durante una hora.

## 12. Manejo de Poblaciones y sistema de control (fichas, registros, etc.)

Toda operación en un Bioterio debe tener registros para el control de las poblaciones, programas de producción, y su fácil identificación, ya sean colonias de producción o animales en experimentación.

Estos registros incluyen:

Tarjetas de jaula y fichas clínicas, se colocan en las jaulas o cajas y los datos que contienen corresponden a la identificación de los ratones que se encuentran en su interior, esos datos son:

- Procedencia.
- Fecha de ingreso de los animales.
- Fecha de traslado de sala.
- Controles realizados.
- Método de reproducción.
- Inoculaciones
- Operario y responsable del proyecto de investigación

Asimismo, se debe llevar un registro de todos los experimentos efectuados con animales de modo que facilite la inspección, en dicho registro se incluirá información sobre los diversos procedimientos realizados y los resultados de los exámenes post mórtem que se practiquen.

Se llevará también, registros de control de temperatura y humedad relativa de los ambientes, así como registros limpieza y desinfección ordinaria y radical.

## 13. Técnica de manejo para ratones jóvenes y adultos

Ofrecen dificultad para su manejo ya que al sentirse capturados con frecuencia muerden. Debe usarse guantes exactos a la mano del operario para que no tenga dificultad en el manipuleo de los animales.

### 13.1. Captura y Traslado de jaula

Se realiza sujetando el espécimen por la cola. Para el traslado de ratones generalmente se sujetan de la región media de la cola con los dedos índice y pulgar. Otra forma es abrazándolo del cuello con el dedo índice y el pulgar.

### 13.2. Sujeción con una mano (mano izquierda)

Saque el ratón de la jaula tomándolo de la zona media de la cola, y apóyelo (sin soltarlo) sobre una superficie rugosa o rejilla contra la que pueda ejercer resistencia.

Coloque la base de la cola del ratón entre sus dedos anular y meñique, dejando libre sus dedos pulgar e índice

Con rapidez pellizque con el dedo pulgar e índice, suave pero firmemente, la piel de la parte superior de cuello y hombros, teniendo especial cuidado con los ratones agresivos ya que pueden darse vuelta y morder.

Levante al animal



Figura 7. Manoseo de ratón para cambio de caja

### 14.3. Técnicas de manejo para ratones lactantes

La manipulación de los recién nacidos debe hacerse rigurosamente con guantes y de manera suave y tranquila, cogerlos uno a uno o en pequeños grupos y posarlos cuidadosamente entre la palma y los dedos de la mano extendidos y juntos; devolver la camada lo más pronto posible, evitando que la madre se dé cuenta.

### 14.4 Inmovilización de animales

#### 14.4.1 Traslado de jaulas

Cuando se trata de animales, se deben evitar la agitación y los movimientos bruscos. Debería de esperarse unos momentos a que los animales investiguen la mano del operador y el olor del guante. Para el traslado de una jaula a otra, así como para el pesaje de los animales, las ratas deben ser manipuladas con suavidad y firmeza, suspendiendo al animal con la mano detrás de las patas delanteras y la cabeza, por la mitad del cuerpo. No se recomienda manipular al animal por la cola, dado que el animal puede volverse más agresivo e intolerante a futuras manipulaciones. Los ratones son manipulados por la base de la cola. Si el camino es largo, el animal debe estar apoyado. En caso de transferencia de la madre con su camada, primero se saca a la madre, para no provocar sus reacciones defensivas cuando se saca el nido de la jaula. El nido y todo su contenido deben ser levantados y llevados a la nueva jaula, que debe volver a colocarse suavemente en el estante.

#### 14.4.2 Contención para inoculaciones

La contención se caracteriza por la inmovilización total o parcial de un animal, en un ambiente cómodo y seguro, utilizando las manos. La contención se realiza en el animal consciente, sujeto a una manipulación que no requiere sedación ni anestesia, pero requiere un posicionamiento preciso de los animales. Una buena sujeción evita movimientos inesperados durante la manipulación.

##### a. Contención manual para ratas

La sujeción manual consiste en apoyar suavemente la mano sobre el lomo del animal y envolverla debajo de las extremidades anteriores. Si es necesario, sujete las extremidades traseras. Esta técnica se puede realizar tanto dentro de la jaula como encima de la rejilla. Otro procedimiento es

también apoyar la mano en el lomo del animal, tirando de toda la piel. A) Contención de una rata sujetándose el cuello con los dedos índice y medio; B) Contención de una rata que afecta la espalda por debajo de las extremidades anteriores.

Para llevar a cabo la contención manual de ratones, el animal debe apoyarse en una barandilla y agarrar su cola por la base, tirando suavemente hacia atrás. Con esto, el animal tiende a avanzar y sujetar la jaula con sus patas delanteras. Luego, el operador debe acercar el dedo índice y el pulgar hacia atrás. El pliegue de piel del cuello, muy cerca de las orejas, se sujeta con el pulgar y el índice, mientras que el resto de la piel suelta

Se aprieta con los otros dedos. Es importante asegurar bien la piel suelta del cuello, para que el animal no pueda voltear y morder al operador. Al girar la mano, el ratón tiene la cara ventral hacia arriba y la cola queda atrapada entre el dedo anular y la punta del dedo meñique. La sujeción no debe ser demasiado apretada, ya que puede dificultar la respiración del animal, los ojos se hinchan y la frecuencia cardíaca aumenta. Tampoco puede quedar demasiado suelto, ya que pueden producirse accidentes: por ejemplo, el animal puede girar y morder o arañar al operador. También se debe prestar atención a la aplicación incorrecta de inyecciones. Por lo tanto, la sujeción perfecta reduce el estrés del animal.



Figura 8. Contención de ratón empujado por el dorso



Figura 9. A) Contención de ratón asegurando su cuello con los dedos; B) Contención del envolviéndolo con los dedos



Figura 10. Contención del ratón empujándolo por el dorso

## 16. Eutanasia: Mecanismos para causar la muerte

Los métodos de eutanasia producen la muerte a través de tres mecanismos

1. hipoxia directa o indirecta
2. depresión directa de neuronas relacionadas con funciones vitales
3. alteración física de la actividad cerebral.

### 16.1 Selección del método de eutanasia

Para que ocurra una muerte humanitaria, sin dolor ni angustia, el animal debe perder el conocimiento antes de perder la actividad motora (muscular). Antes de realizar la eutanasia, se debe intentar reducir la angustia, el miedo, la aprensión y la ansiedad del animal. Manéjelo siempre con suavidad y calma y fuera de su alojamiento.

El Cuadro 14 presenta los criterios a considerar al elegir el método de eutanasia.

Especies animales
Medios disponibles para la contención del animal
Habilidad de la persona que realizará la eutanasia
Número de animales a ser eutanasiados
Tamaño de los animales a ser eutanasiados

### 16.2 Métodos

#### 16.2.1 Métodos químicos

##### a. Agentes inhaladores

Los inhalantes utilizados para la eutanasia incluyen gases anestésicos (halotano, enflurano, sevoflurano e isoflurano) y gases no anestésicos (dióxido de carbono, nitrógeno, argón y monóxido de carbono). En ambos casos, la eutanasia se produce con la administración excesiva del gas elegido. En cuanto a su uso, cada agente tiene ventajas y desventajas. Los agentes cloroformo y el éter ya no se aceptan como métodos de eutanasia, debido no solo a sus potenciales riesgos carcinógenos, hepatotóxicos y nefrotóxicos, en el caso del cloroformo, de efectos acumulativos para el empleado, sino también por sus características inflamables y explosivas, como es el caso de ether. La inhalación de una concentración de CO<sub>2</sub> al 7,5% aumenta el umbral del dolor y concentraciones más altas tienen un efecto anestésico.

#### b. Eutanasia de CO<sub>2</sub>

El gas utilizado es el cilindro comprimido debido a la posibilidad de regular la entrada de gas a la cámara (Figura 29). No se aceptan fuentes distintas del aire comprimido en el cilindro. Con la cámara que contiene una concentración de 70% de CO<sub>2</sub> y 30% de O<sub>2</sub>, se produce una depresión rápida del sistema nervioso central, pero la exposición repentina de animales conscientes a concentraciones de CO<sub>2</sub> del 70% o más causa angustia. Lo correcto es ajustar la velocidad de llenado de la cámara con CO<sub>2</sub> a un caudal del 20% del volumen de la cámara por minuto, añadido al aire existente. De esta forma, es posible obtener un equilibrio adecuado de mezcla de gases para obtener una rápida inconsciencia de los animales con un mínimo sufrimiento. El CO<sub>2</sub> es un gas de bajo costo, no inflamable y no explosivo, que ofrece un bajo riesgo laboral si se utiliza con equipos adecuados y con un mantenimiento periódico para evitar el riesgo de fugas. El flujo de gas debe mantenerse durante aproximadamente 1 minuto después de que se verifique la muerte aparente o hasta que se asegure la muerte clínica.



(Figura 29) Cámara de CO<sub>2</sub>

#### c. Agentes no inhalantes

El uso de agentes farmacéuticos inyectables es la forma más confiable y rápida de realizar la eutanasia. La mayoría de los agentes anestésicos inyectables se aceptan para la eutanasia por sobredosis (administración del doble o el triple de la dosis anestésica recomendada). Entre ellos, los barbitúricos son los más utilizados, conduciendo primero a una depresión del sistema respiratorio y luego a un paro cardíaco, que ocurre cuando se alcanza un plano profundo de anestesia. Si la especie animal dificulta el acceso venoso para la administración del agente, se puede utilizar la vía intraperitoneal, pero con el uso de una sustancia no irritante que no tenga

acción bloqueante neuromuscular. Al administrar el agente por vía intraperitoneal, el animal puede tardar un tiempo en alcanzar los niveles más profundos de anestesia, por lo que debe colocarse dentro de una caja limpia y en un ambiente tranquilo y silencioso, para minimizar la excitación y el trauma.

#### 16.2.2 Métodos físicos

Los métodos físicos de eutanasia aceptables bajo restricción en roedores son la dislocación cervical (ratas que pesan menos de 200 g) y la decapitación con guillotina. En comparación con otros métodos de eutanasia, son bastante eficientes, pero estéticamente desagradables. Sin embargo, deben ser practicados por técnicos altamente calificados y capacitados y con el equipamiento adecuado, para que el procedimiento sea rápido y humanitario. En general, los métodos físicos de eutanasia se utilizan cuando el desempeño del método químico interfiere de alguna manera con los datos de la investigación.

##### a. Disloque cervical

En esta técnica, la muerte del animal ocurre cuando se aplica presión en la base de su cráneo, desplazando su columna vertebral y separando el cráneo de la médula espinal. Aparentemente, si lo practica una persona capacitada y capacitada, es un método humanitario.

##### Decapitación guillotina

Este método permite obtener muestras sin alteración anatómica del cerebro y tejidos.

Además de fluidos y tejidos no contaminados químicamente. Esta técnica, que puede utilizarse en la eutanasia de roedores y conejos pequeños consiste en utilizar una guillotina especial para la eutanasia. En este método, el cuello del animal se corta con un instrumento cortante. Sin embargo, es necesaria la adaptación previa de los animales (mínimo una semana) al equipo que se utilizará en el procedimiento, así como la formación del operador. Además, el uso de este método debe estar muy bien justificado en el protocolo experimental.

#### 16.3 Eutanasia de fetos y neonatos

Para evaluar cuál es el mejor método de eutanasia, se debe identificar la edad del feto o del recién nacido y los animales serán necesarios para el estudio.

Los animales recién nacidos son relativamente resistentes a la hipoxia; por tanto, antes de llevarlos a la eutanasia, es necesario considerar este factor, ya que la inhalación de agentes como el CO<sub>2</sub> tarda más en producir inconsciencia en los neonatos que en los animales adultos. La eutanasia debe confirmarse con un método físico secundario.

En el caso de los fetos hasta el día 15 de gestación, todavía no hay percepción de dolor. Sin embargo, desde el día 15 del embarazo hasta el nacimiento, se produce el desarrollo neuronal, con la probabilidad de que las señales de dolor se procesen bioquímica y

neurofisiológicamente. Sin embargo, la evidencia reciente implica que los fetos en esta fase no son sensibles ni conscientes y, por lo tanto, son incapaces de percibir el dolor.

En esta fase, si los fetos no son necesarios para el estudio, la eutanasia de la madre debe asegurar la rápida anoxia cerebral de los fetos. El método de eutanasia recomendado por la madre es la exposición al CO<sub>2</sub>, seguida de dislocación cervical, decapitación o neumotórax bilateral. Si son necesarios fetos para el estudio, en el caso de fijación de tejidos y eutanasia por congelación, el feto debe ser previamente anestesiado.

#### Feto

##### Hasta 15 días de edad

El animal todavía está en el útero y, por lo tanto, aún no ha respirado. En esta fase, al no tener percepción del dolor, la eutanasia de la madre, privándola del riego sanguíneo, asegura la eutanasia.

##### 15 días hasta el nacimiento

Si los animales están expuestos al medio extrauterino y, por tanto, respiran, la eutanasia debe ser por método físico, como la decapitación con tijeras quirúrgicas. Si el útero y los sacos amnióticos están intactos, significa que el animal no ha respirado. Así, la simple extirpación del útero provoca una parada repentina de la oxigenación de la sangre a los fetos, provocando su muerte.

#### Recién nacidos

##### Hasta 10 días de edad

Se aceptan inyecciones de anestésicos químicos y métodos físicos. En esta fase, son sensibles a los anestésicos inhalados, aunque puede ser necesaria una exposición prolongada y se recomienda un método físico secundario para asegurar la muerte. Si se requiere inmersión en nitrógeno líquido o un método de fijación / perfusión, el animal debe ser anestesiado previamente.

##### Más de 10 días de edad

Siga las recomendaciones de eutanasia para animales adultos de la misma especie.

#### Evidencia de cese de signos vitales

Es muy importante que el responsable de la eutanasia verifique que el animal está realmente muerto, especialmente antes de descartar su cadáver. Por ejemplo, puede suceder que el animal se encuentre en una narcosis profunda y, cuando se interrumpe la administración del inhalador de eutanasia (por ejemplo, en una cámara de CO<sub>2</sub> eutanasia), eventualmente se recupere. Por lo tanto, el operador debe estar capacitado para verificar la ausencia de signos vitales en el animal: evaluar si hubo un cese de los latidos del corazón, si no hay reflejo al tacto del globo ocular y si las membranas mucosas son violáceas, indicando anoxia, entre otros.

#### 17. Eliminación de cadáveres de animales

### 17.1 Eliminación de Animales no contaminados

1. Deposite los cadáveres de animales en bolsas blancas identificadas con el símbolo de peligro biológico.
2. Selle las bolsas.
3. Identificar las bolsas con la siguiente información: generador, peso, fecha y observaciones relevantes.
4. Empaque las bolsas en el congelador.
5. Sacar las bolsas del congelador los días de recolección por parte de la empresa contratada para su eliminación.
6. Registre el número de bolsas en el libro de registro de eliminación.

### 17.2 Eliminación de materiales biológicos y canales contaminados

1. Empaque en materiales aptos para esterilizar en autoclave todos los materiales que entraron en contacto con el animal contaminado, tales como: jaulas, jaulas, bebederos y virutas.
2. Para residuos pesados y húmedos, utilice bolsas dobles.
3. Después de sacrificar a los animales contaminados, empaque la canal en una bolsa apropiada para esterilizarla en autoclave.
4. Insertar el embalaje con material biológico contaminado en el autoclave de doble puerta en el lateral de la sección de experimentación.
5. Esterilizar los paquetes mediante el proceso de autoclave.
6. Retire el material esterilizado en autoclave del lado de la sección de higiene y esterilización.

Anexo.

## PROTOCOLO EXPERIMENTAL

### 1. Identificación de experimentos

1.1. Título del Proyecto:

\_\_\_\_\_

1.2 Propósito académico:

Investigación ( ) Docencia ( )

### 2. Equipo

Investigador responsable: \_\_\_\_\_

Estudiante responsable: \_\_\_\_\_

Colaboradores:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Unidad / bloque:

\_\_\_\_\_ Extensión

/ \_\_\_\_\_ Teléfono de

emergencia: \_\_\_\_\_ E-mail:

\_\_\_\_\_

2.1 Calificación del equipo con respecto a experiencia previa y formación:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ 2.1.1 ¿El  
investigador (estudiantes involucrados) necesita formación?

\_\_\_\_\_

2.2 Periodo del experimento:

Comenzar terminar \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

2.3 Origen de los animales: \_\_\_\_\_

2.4 Modelo animal:

( ) Rata ( ) Ratón 2.5 Linaje \_\_\_\_\_ Género ( ) Macho ( ) Hembra Número de  
animales \_\_\_\_\_

### 3. Procedimientos experimentales

Ayuno: ( ) Sí ( ) No \_\_\_\_\_

Período de restricción \_\_\_\_\_

Restricción de agua: ( ) Sí ( ) No \_\_\_\_\_ Período de restricción \_\_\_\_\_ Inmovilización del animal: ( ) Sí ( ) No. Como \_\_\_\_\_ Se producirá la lesión: ( ) Sí ( ) No. Cuál \_\_\_\_\_ Cirugía: ( ) Sí ( ) No \_\_\_\_\_ Anestesia: ( ) Sí ( ) No. Cuál \_\_\_\_\_ Recuperación posquirúrgica: ( ) Sí ( ) No. Justificar \_\_\_\_\_

Uso de analgésicos: ( ) Sí ( ) No.

Justificar \_\_\_\_\_

3.1 ¿Implicará dolor intencional en animales? ( ) Sí ( ) No.

Justificar \_\_\_\_\_

3.2 ¿Exposición a agentes químicos / físicos / biológicos / mecánicos? Cuales son \_\_\_\_\_

3.3 ¿Los materiales utilizados durante los procedimientos experimentales, así como los animales muertos, deben esterilizarse en autoclave (esterilizarse antes de su eliminación)? \_\_\_\_\_

3.4 ¿Habrá extracción de fluidos? Especificar:

rutas \_\_\_\_\_

Frecuencia de muestras \_\_\_\_\_

Número de muestras \_\_\_\_\_

3.5 ¿Cuál es el método de eutanasia? \_\_\_\_\_

4. ¿Existe algún riesgo para el empleado o investigador? Cuales

son \_\_\_\_\_

4.1 Otros comentarios relevantes sobre el experimento:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

---

---

Anexo: PROGRAMACIÓN HORARIO DE LECCIONES

Estudiante):

Tutor):

Laboratorio / Departamento:

Proyecto:

Número de protocolo

Teléfono / extensión de contacto

- Bibliografía

1. Baumans V. El ratón de laboratorio. En: Poole T. El manual de la UFAW sobre el cuidado y manejo de animales de laboratorio. 7ª ed. Británico: Blackwell Science; 2006. v.1, pág. 282-312. 2. Rivera EAB. Bienestar en la experimentación animal. En: Feijó AGS, Braga LMGM, Pitrez PM. Los animales en la investigación y la docencia: aspectos éticos y técnicos. Porto Alegre: EdIPUCRS; 2010. p. 74-88.
3. Koolhaas JM. La rata de laboratorio. En: Poole T. El manual de la UFAW sobre el cuidado y manejo de animales de laboratorio. 7ª ed. Británico: Blackwell Science; 2006. v.1, pág. 313-30.
4. Andersen ML, D'Almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF. Principios éticos y prácticos del uso de animales de experimentación. São Paulo: UNIFESP - Universidad Federal de São Paulo; 2004. 166p.
5. Consejo Nacional de Investigaciones. Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio. 8a ed. Washington: Prensa de las Academias Nacionales; 2011 [Consultado el 1 de febrero de 2012]. Disponible en: <http://oacu.od.nih.gov/regs/guide/guide.pdf>.
6. Souza NL. Comportamiento, contención y sexado de especies de laboratorio convencionales. En: De Luca RR, Alexandre SR, Marques T, Souza NL, Merusse JLB, Neves SP. Manual para técnicos en bioterismo. São Paulo: Gráfico de ganadores; 1996. P.67-78.
7. Ko GM, De Luca RR. Ratón. En: Lapchik VBV, Mattaraia VGM, Ko GM. Cuidado y manejo de animales de laboratorio. São Paulo: Atheneu; 2009. P.137-65.
8. Ebisui L, Fontes RS, Lapchik VBV. Ratón. En: Lapchik VBV, Mattaraia VGM, Ko, GM. Cuidado y manejo de animales de laboratorio. São Paulo: Atheneu; 2009. p. 229-50.

9. Hofstetter J, Suckow A, Hickman DL. Morfofisiología. En: Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL. La rata de laboratorio. Estados Unidos: Elsevier Academic Press; 2006. P.93-125.
10. Hoitinga MR. Nutrición de ratones de laboratorio. En: Hedrich H, Bullock G, Petrusz P. El manual de animales de experimentación: el ratón de laboratorio. EE.UU: Elsevier Academic Pres; 2004. P.463-79.
11. Neale RJ. Coprofagia en ratas con deficiencia de hierro. Animales de laboratorio. 1982; 16: 204 -7.
12. Manser CE, Morris TH, Broom DM. Una investigación sobre los efectos del suelo de jaulas sólidas o de rejilla en el bienestar de las ratas de laboratorio. Animales de laboratorio. 1995; 29: 353 -63.
13. Heffner HE, Heffner RS. Rangos de audición de animales de laboratorio. Revista de la Asociación Americana de Ciencia Animal de Laboratorio. 2007; 46: 11-3.
14. Teixeira MA, Filho AFL. Impacto de factores ambientales. En: Lapchik VB, Mattaraia VGM, Ko GM Cuidado y manejo de animales de laboratorio. São Paulo: Atheneu; 2009. P.101-11.
15. Rivera EB. Bienestar de los animales. En: Lapchik VB, Mattaraia VGM, Ko GM. Cuidado y manejo de animales de laboratorio. São Paulo: Atheneu; 2009. P.59-69.
16. Directrices sobre alojamiento y cría de animales de laboratorio. Recursos animales de investigación .Disponible en: <http://www.ahc.umn.edu/rar/housing.html>.
17. Directrices para el dolor y la angustia en animales de laboratorio: responsabilidades, reconocimiento y alivio [consultado el 18 de enero del 2012]. Disponible en: [http://oacu.od.nih.gov/ARAC/documents/Pain\\_and\\_distress.Pdf](http://oacu.od.nih.gov/ARAC/documents/Pain_and_distress.Pdf).
18. Rivera EAB. Analgesia en animales de experimentación. En: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. Animales de laboratorio: cría y experimentación. Río de Janeiro: Editora Fiocruz; 2002. p.2
19. Santos BF. Cría y manipulación de ratones. En: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. Animales de laboratorio: cría y experimentación. Río de Janeiro: Editora Fiocruz; 2002. P.115-8.
20. Santos BF. Cría y manipulación de ratas. En: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. Animales de laboratorio: cría y experimentación. Río de Janeiro: Editora Fiocruz; 2002. P.119-21.
21. Mohan C. Canibalismo dependiente de la edad en una colonia de ratas albinas. Animales de laboratorio. 1974; 8: 83 -4.
22. Petter WL. Canibalismo en ratas y ratones. Actas de la Royal Society of Medicine. 1968; 61 (12): 1295-6.
23. Hedrich HJ, Mossmann H, Nicklas W. Vivienda y mantenimiento. En: Hedrich H, Bullock G, Petrusz P. El manual de animales de experimentación: el ratón de laboratorio. Estados Unidos: Elsevier Academic Press; 2004. p. 395-408.

24. Van de Weerd HA, Baumans V, Koolhaas JM, Van Zutphen LFM. Ceba la respuesta conductual específica al enriquecimiento ambiental en el ratón. *Revista de ciencia animal experimental*. 1994; 36: 117-27.
25. Hutchinson E Avery A, Vandewoude S. Enriquecimiento ambiental para roedores de laboratorio. *Revista ILAR*. 2005; 46 (2): 148-61.
26. Marques JM, Olsson IAS. El efecto de la vivienda antes y después del destete en el comportamiento del ratón de laboratorio (*Mus musculus*). *Animales de laboratorio*. 2007; 41: 92-102.
27. Olsson AS, Dahlborn K. Mejora de las condiciones de alojamiento para ratones de laboratorio: una revisión del "enriquecimiento ambiental". *Animales de laboratorio*. 2002; 36: 243 -70.
28. Gnadt BJ. Perspectivas éticas y legales. En: Suckow MA, Weisbroth ST, Franklin CL. *La rata de laboratorio*. Estados Unidos: Elsevier Academic Press; 2006. P.53-70.
29. Mattaraia VGM. Enriquecimiento ambiental. En: Lapchik, VBV, Mattaraia VGM, Ko GM. *Cuidado y manejo de animales de laboratorio*. São Paulo: Atheneu; 2009. P.537-47.
30. Van de Weerd HA, Baumans V. Enriquecimiento ambiental en roedores. En: Smith CP, Taylor V. *Recursos de información sobre enriquecimiento ambiental para animales de laboratorio: aves, gatos, perros, animales de granja, hurones, conejos y roedores*. Inglaterra: AWIC Resource Series; norte. 2, septiembre de 1995. P.145-9.
31. Sherwin CM. La motivación de los ratones de laboratorio alojados en grupo para abandonar una jaula de laboratorio enriquecida. *Conducta animal*. 2007; 73: 29 -35.
32. Van de Weerd HA, Van Loo PLP, Van Zutphen LFM, Koolhaas JM, Baumans V. Preferencias para el material de anidación como medio ambiente para ratones de laboratorio. *Animales de laboratorio*. 1997; 31: 133-43.
33. Van loo PLP, Blom HJM, Meijer MK, Baumans V. Evaluación del uso de enriquecimientos ambientales disponibles comercialmente por ratones de laboratorio mediante pruebas de preferencia. *Animales de laboratorio*. 2005; 39: 58-67.
34. Baumans, V. Enriquecimiento ambiental para roedores y conejos de laboratorio: requisitos de roedores, conejos e investigación. *Revista ILAR*. 2005; 46 (2): 162-70.
35. Smith AL, Corrow DJ. Modificaciones de las condiciones de cría y alojamiento de los roedores de laboratorio para mejorar su bienestar. *Revista ILAR*. 2005; 46 (2): 140-7.
36. Steward K. Desarrollo de un programa de enriquecimiento ambiental usando estrategias simples. *Boletín del Centro de Información sobre Bienestar Animal*. 2004; 12 (1-2): 1-40.
37. Poole T, Dawkins MS. Enriquecimiento ambiental para vertebrados. En: Poole T. *El manual de la UFAW sobre el cuidado y manejo de animales de laboratorio*. 7ª ed. Británico: Blackwell Science; 2006. v.1, p.13-20.

38. Chmiel DJ, Noonam M. Preferencia de ratas de laboratorio para objetos de estímulo potencialmente enriquecedores. *Animales de laboratorio*. 1996; 30: 97-101.
39. Van de Weerd HA, Baumans V. Evaluación del enriquecimiento ambiental para ratones de laboratorio. *Boletín AWIC*. 1999; 9 (3-4) [consultado el 5 de septiembre de 2011]. Disponible en: <http://www.nal.usda.gov/awic/newsletters/v9n3/9n3weerd.htm#toc1>.
40. Neves SP, Fontes RS, Ong FMP, Santos RA, Colli C. Mejora del bienestar de los roedores de laboratorio mediante la introducción del enriquecimiento ambiental. En: *Anales del 7º Congreso Mundial de Roma; 2009 30 de agosto - 3 de septiembre; Roma, Italia*. Roma: Sociedad Suiza ALTEX Edition; 2009. p. 336.
41. Fontes RS, Santos RA, Ong FMP, Neves SMP, Balieiro JCC, Damy SB. Efecto del enriquecimiento ambiental en la producción de ratones C57BL / 6 mantenidos en diferentes sistemas de alojamiento. *RESBCAL - Revista de la Sociedad Brasileña de Ciencia en Animales de Laboratorio*. 2012; 1 (1): 5463.
42. Würbel H. ¿Viviendas ideales? Efectos de la vivienda en el cerebro y el comportamiento de los roedores. *Tendencias en neurociencias*. 2001; 24: 207-11.
43. Augustsson H, Van de Weerd HA, Kruitwagen, CLJJ, Baumans, V. Efecto del enriquecimiento sobre la variación y resultados en la prueba de luz / oscuridad. *Animales de laboratorio*. 2003; 37: 328 -40.
44. Van de Weerd HA, Van Loo PL, Baumans V. Enriquecimiento ambiental: ¿margen de reducción? *Alternativas a los animales de laboratorio*. 2004; 32 (Supl. 2): 69-71.
45. Würbel H. El enriquecimiento ambiental no altera la estandarización de los experimentos con animales. *Altex*. 2007; 24: 70-3.
46. Würbel H, Garner JP. Refinamiento de la investigación sobre roedores mediante el enriquecimiento ambiental y la aleatorización sistemática. *NC3Rs - Centro Nacional para el Reemplazo, Refinamiento y Reducción de Animales en Investigación*. 2007: 1-9.
47. Lawlor MM. *Cuartos cómodos para ratas en instituciones de investigación*. 9ª ed. Washington: Instituto de Bienestar Animal; 2002. P.26-32.
48. Hess SE, Rohr S, Dufour BD, Gaskill BN, Pajor EA, Garner JP. Mejoras para el hogar: los ratones C57BL / 6J que recibieron materiales de anidación más naturalistas construyen mejores nidos. *Revista de la Asociación Americana de Ciencia Animal de Laboratorio*. 2008; 47 (6): 25-31.
49. Sherwin CM. Observaciones sobre la prevalencia de la construcción de nidos en ratones de la cepa TO no reproductores y su uso de dos materiales de nidificación. *Animales de laboratorio*. 1997; 31: 125-32.
50. Van Loo PLP, Kruitwagen CLJJ, Van Zutphen LFM, Koolhaas JM, Baumans V. Modulación de la agresión en ratones machos: influencia del régimen de limpieza de la jaula y marcas de olor. *Bienestar de los animales*. 2000; 9 (3): 281-95.

51. Brasil. Ministerio de Ciencia y Tecnología. Comisión Técnica Nacional de Bioseguridad (CTNBio). Instrucción Normativa No. 7, Normas para trabajos en contención con organismos modificados genéticamente-OGM. Gaceta Oficial de la República Federativa de Brasil. Brasilia, 9 de junio. 1997, sección 3, pág. 11833.
52. Marques N, Menna-Barreto L. Cronobiología: principios y aplicaciones. 3ª ed. São Paulo: Editorial de la Universidad de São Paulo; 1999. 448p
53. Clough G. La casa de los animales: diseño, equipamiento y control ambiental. En: Poole T. El manual de la UFAW sobre el cuidado y manejo de animales de laboratorio. 7ma ed. Británico: Blackwell Science; 2006. v.1, p. 97-136.
54. Brasil. Consejo Nacional de Salud, Resolución No. 1 de 1988, art. 64. Disponible en: [http://concilio.saude.gov.br/resolucoes/reso\\_88.htm](http://concilio.saude.gov.br/resolucoes/reso_88.htm).
55. Consejo Nacional de Investigaciones. Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio. 7ma ed. Washington: Prensa de las Academias Nacionales; 2010.
56. Brasil. Ministerio del Medio Ambiente. Consejo Nacional de Medio Ambiente (CONAMA). Resolución No. 358 de 2005. Disponible en: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35805.pdf>.
57. Federación de Asociaciones Europeas de Ciencia Animal de Laboratorio (FELASA). Recomendaciones de Felasa para la educación y formación de personas que trabajan con animales de laboratorio: categorías A y C. Lab Anim. 1995; 29: 121-31.
58. Brasil. Comisión Técnica Nacional de Bioseguridad (CTNBio). Resolución Normativa No. 2, de 27 de noviembre de 2006. Disponible en: <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/3913.html>.
59. Torrallardona AV. Armonización y estandarización. Buenas prácticas de laboratorio (BPL). En: Zúñiga JM, Marí JAT, Milocco SN, Piñeiro R. Ciencia y tecnología en la protección y experimentación animal. Madrid: Mcgraw - Hill Interamericana; 2001. P.629-42.
60. Brasil. Ministerio de Salud Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. Criterios para calificar laboratorios de acuerdo con los principios de buenas prácticas de laboratorio (BPL). Brasilia 2001. Disponible en: [http://www.anvisa.gov.br/reblas/procedimentos/GGLAS\\_02\\_bpl.pdf](http://www.anvisa.gov.br/reblas/procedimentos/GGLAS_02_bpl.pdf).
61. Brasil. Decreto No. 5.591 del 22 de noviembre de 2005. Disponible en: <https://legislacao.planalto.gov.br/LEGISLA/Legislacao.nsf>.
62. Neves SMP, Chaguri LCAG, Fontes RSF, ONG FMP. Bioseguridad en galpones de animales. En: Hirata MH, Hirata RDC, Mancini, Filho JM. Manual de bioseguridad. 2ª ed. Barueri: Manole; 2012. P.193-211.
63. Brasil. Ministerio de Trabajo. Ordenanza No. 25 (NR-6). Disponible en: <http://portal.mte.gov.br/legislacao/portaria-n-25-de-15-10-2001.htm>.

64. Molinaro EM, Majerowicz J, Valle S. Bioseguridad en casas de animales. Río de Janeiro: Interciência; 2007. 236p.
65. Botahm PA, Davies GE, Teasdale EL. Alergia a los animales de laboratorio: un estudio prospectivo de su incidencia y de la influencia de la atopia en su desarrollo. *Brit J Ind Med.* 1987; 44: 627-32.
66. Carissimi, AS, Chaguri LACG, Teixeira MA, Mori CMC, Macchione, M, Anna ETYGS, Saldiva, PHN, Souza, NL, Merusse JB. Efectos de dos sistemas de ventilación y la frecuencia de cambio de la ropa de cama sobre los factores ambientales de la jaula en ratas (*Rattus norvegicus*). *Animal Technol.* 2000; 51 (3): 161.
67. Andersen ML, D'Almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF. Procedimientos experimentales. En: Andersen ML, D'Almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF. Principios éticos y prácticos del uso de animales de experimentación. São Paulo: UNIFESP - Universidad Federal de São Paulo; 2004. p. 45-70.
68. Consejo Nacional de Investigaciones. Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio. 8ª ed. Washington: Prensa de las Academias Nacionales; 2011. 248p. Disponible en: <http://oacu.od.nih.gov/regs/guide/guide.pdf>.
69. Diehl HR, Morton D, Pfister R, Rabemampianema Y, Smith D, Vidal JM, Van de Vorstenbosch CA. Una guía de buenas prácticas para la administración de sustancias y la extracción de sangre, incluidas las rutas y los volúmenes. *J Appl Toxicol.* 2001; 21: 15-23.
70. Instituto Nacional de Salud. Disponible en: <http://bioethics.od.nih.gov/animals.html>.
71. Jackson LR, Fox JG. Políticas y directrices institucionales sobre adyuvantes y producción de anticuerpos. *ILAR J.* 1995; 37 (3): 141-50.
72. Consejo Canadiense de Cuidado Animal en la Ciencia. Guía CCAC para el cuidado y uso de animales de experimentación. 2ª ed. Canadá; 1993. v.1.
73. Baumans V. El ratón de laboratorio. En: Poole T. El manual de la UFAW sobre el cuidado y manejo de animales de laboratorio. 7ma ed. Británico: Blackwell Science; 2006. v.1, p.282-312.
74. Santos BF. Cría y manipulación de ratones. En: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. Animales de laboratorio: cría y experimentación. Río de Janeiro: Fiocruz; 2002. P.115-8.
75. Consejo Nacional de Investigaciones. Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Bethesda, EE.UU. Departamento de Salud y Servicios Humanos, Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud; 1985. (Publicación de los NIH, no 90-23S).
76. Bogdanske JJ, Stelle SH, Riley MR, Schiffman BM. Rata de laboratorio: técnicas de procedimiento. EE.UU. Crs Press; 2011. 80p.

77. Lapchik VBV, Mattaraia VGM. Técnicas de recogida de fluidos y vías de administración. En: Feijó AGS, Braga LMGM, Pitrez PMC. Los animales en la investigación y la docencia: aspectos éticos y técnicos. Porto Alegre: EdiPUCRS; 2010. P.191-7.
78. Bogdanske JJ, Stelle SH, Riley MR, Schiffman BM. Ratón de laboratorio: técnicas de procedimiento. EE.UU. Crs Press; 2011. 80p.
79. Flecknell P. Anestesia para animales de laboratorio. 3ra ed. United Kingdon: Academic Press; 2009. 300 p.
80. Lapchik VBV. Vías de administración y recogida de fluidos. En: Lapchik VBV, Mattaraia VGM, Ko GM. Cuidado y manejo de animales de laboratorio. São Paulo: Atheneu; 2009. p. 575-92.
81. FELASA. Recomendaciones para el control sanitario de colonias de cría de ratones, ratas, hámsteres, cobayas y conejos. 1999.
82. Asociación Americana de Medicina Veterinaria (AVMA). Informe del Panel AVMA sobre eutanasia. JAVMA. 2007; 218 (5).
83. NRC. Consejo nacional de investigación. Junta de Agricultura. Comité de Nutrición Animal. Subcomité de Animales de Laboratorio. Necesidades de nutrientes de los animales de laboratorio. 4ª ed. Rdo. 1995. 2. Coates ME, editor. Directrices del ICLAS sobre la selección y formulación de dietas para animales en investigación biomédica. Londres: Instituto de Biología; 1987. 3. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN - 93 dietas purificadas para roedores de laboratorio: informe final del comité de redacción ad hoc del Instituto Americano de Nutrición sobre la reformulación de la dieta para roedores AIN - 76A. J Nutr. 1993; 123: 1939-51. 4. Knapka JJ. Nutrición. En: Foster HL, Small JD, Fox JG, editores. El investigador biomédico. Nueva York: Academic Press; 1983. v.3, p.51-67. 5. Neves SP, Damy SB, Coli C, Tolosa EMC. Esterilización de piensos para animales de laboratorio mediante irradiación gamma. Control de contaminación. 2005; Feb. 36-8.