

**MATERIAL
DIDÁCTICO PARA
ESTUDIANTES**

GUÍA GENERAL PARA EL CUIDADO Y USO DE ANIMALES

**FACULTAD DE QUÍMICA BIOQUÍMICA
Y FARMACIA**



Universidad Nacional
de San Luis

SERIE DIDÁCTICA: MATERIAL DIDÁCTICO PARA ESTUDIANTES

GUÍA GENERAL PARA EL CUIDADO Y USO DE ANIMALES

Autora:

Dra. María Belén DELSOUC

Colaboradores:

Dra. Graciela WENDEL

Dra. Nadia BACH

Téc. Gerardo RANDAZZO

Dr. Eduardo Maximiliano CHAVES

Méd. Vet. Jorge PERINO

Dra. Cecilia Mariana PERALTA



FACULTAD DE QUÍMICA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS

2022

Decana

Dra. Mercedes Edith CAMPDERRÓS

Vice Decana

Dra. Lucía Beatriz FUENTES

Secretaria académica

Dra. Estela Isabel GASULL

Comisión de la Serie Didáctica

Coordinadora

Dra. María Cristina ALMANDOZ

Integrantes

Departamento de Bioquímica
y Ciencias Biológicas

Dra. Susana I. SÁNCHEZ

Dra. Verónica P. FILIPPA

Departamento de Farmacia

Dr. Luis A. DEL VITTO

Dra. Alejandra O. MARIA

Departamento de Química

Dra. Yamina A. DÁVILA

Dra. María de los Ángeles ÁLVAREZ

SUMARIO

La publicación periódica Serie Didáctica ha sido creada en el ámbito de la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis (Ordenanza N° 008/07-CD) con el fin de proporcionar material de estudio a los estudiantes de las Carreras de grado impartidas en la Facultad.

Actualmente, la SERIE DIDÁCTICA: MATERIAL DIDÁCTICO PARA ESTUDIANTES (Resolución N° 269/16) ofrece guías de Trabajos Prácticos de Laboratorio y de campo, guías de resolución de problemas, material teórico, propuestas de estudios dirigidos y comprensión de textos, entre otros materiales, elaborados por el cuerpo docente de las diferentes Áreas de Integración Curricular de la Facultad. Estas producciones didácticas significan un aporte para cubrir necesidades académicas acorde al enfoque de cada asignatura o que no se encuentran habitualmente en bibliografía específica. Las mismas están disponibles en la página de la UNSL (<http://www.fqbf.unsl.edu.ar/mda.html>) lo que facilita la accesibilidad por parte de los estudiantes, docentes y comunidad educativa en general, garantizando la calidad de la visualización y la amplia difusión del material publicado en este sitio. De igual modo, la Serie Didáctica realiza una extensión invitando a docentes y alumnos de diferentes niveles educativos a participar, crear, producir y utilizar este espacio fomentando así el vínculo entre esta Institución y la comunidad.

En nuestra opinión, es de vital importancia producir y compartir el conocimiento con los estudiantes y la sociedad. De este modo, se tiende a facilitar los procesos de enseñanza y de aprendizaje y la transmisión de una idea directriz de conducta humana y científica, fortaleciendo los vínculos entre docentes-alumnos-conocimientos y sociedad.

Dado que la presente SERIE DIDÁCTICA resulta de la participación de numerosos actores, ante los posibles errores humanos y cambios en la ciencia, ni los editores ni cualquier otra persona que haya participado en la preparación del material didáctico garantizan íntegramente que la información sea precisa o completa.

PRÓLOGO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) fue establecido con el fin de regular y asegurar el uso responsable y bienestar de los animales de experimentación utilizados con fines científicos y docencia en la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia.

Desde la Secretaría de Ciencia y Técnica de la FQByF auspiciamos y celebramos la publicación de la Guía General para el Cuidado y Uso de Animales de la Facultad, UNSL – Parte 1. Este material didáctico de excelente calidad, seguramente constituirá una obra de consulta permanente para nuestros/as docentes e investigadores/as, becarios/as y estudiantes.

Los esfuerzos colectivos, como el impulsado desde el Comité de Cuidado y Uso de Animales y la Secretaría de Ciencia y Técnica FQByF, constituyen un marco de trabajo fundamental que seguramente continuará con la producción de varios tomos o partes de esta Guía. Se trata sin duda de un punto de partida para continuar profundizando y mejorando nuestras prácticas sobre el Cuidado y Uso de Animales en el ámbito de la Facultad.

Dr. Fabricio Damián Cid
Secretario de Ciencia y Técnica
Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia
Universidad Nacional de San Luis

PRESENTACIÓN DE LA GUÍA GENERAL PARA EL CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA, UNSL - PARTE 1

La decisión de utilizar animales en una investigación requiere pensamiento crítico, juicio y análisis. El uso de animales de laboratorio es un privilegio otorgado por la sociedad a la comunidad de investigadores con la expectativa de que dicho uso aporte nuevos conocimientos o conduzca a una mejora en el bienestar humano y/o animal. Por consiguiente, exige un cuidado y uso responsable y humanitario de los mismos.

Esta Guía, elaborada a partir de la recopilación de información de diferentes fuentes bibliográficas nacionales e internacionales, tiene como propósito dar a conocer los aspectos considerados importantes para llevar a cabo buenas prácticas de manejo y uso de roedores de laboratorio. Pretende convertirse en un instrumento de referencia para investigadores, docentes, estudiantes de grado y postgrado, becarios y pasantes de nuestra institución, que requieran ratas o ratones en el desempeño de su labor.

Los temas abordados en la Parte 1, nombrada así en consideración de una próxima publicación, son: el Bioterio de la UNSL (instalaciones, personal y equipamiento), las normas de higiene y seguridad y los procedimientos básicos de limpieza y desinfección; la ética en el uso de animales y el principio de las tres Rs; características generales, manipulación y cuidado básico de ratas y ratones; diferentes técnicas de sujeción para procedimientos simples y complejos; los métodos utilizados para la identificación de roedores; sexado; ciclo estral y citología vaginal.

En la elaboración del presente documento participaron los miembros actuales del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA)-UNSL:

Autora:

Dra. María Belén Delsouc

Colaboradores:

Dra. Graciela Wendel

Dra. Nadia Bach

Téc. Gerardo Randazzo

Dr. Eduardo Maximiliano Chaves

Méd. Vet. Jorge Perino

Dra. Cecilia Mariana Peralta

ÍNDICE

BIOTERIO	4
Normas de higiene y seguridad	5
Limpieza y desinfección	6
Recomendaciones generales.....	7
Breve descripción de procedimientos	7
ÉTICA EN EL USO DE ANIMALES	14
Principio de las tres Rs	14
RATAS Y RATONES	16
Características generales	16
Manejo y cuidado básico	18
El microambiente de los animales de laboratorio	19
El macroambiente de los animales de laboratorio.....	21
TÉCNICAS DE SUJECCIÓN	24
Manipulación de ratas y ratones para el traslado a otra jaula	24
Manipulación de crías	25
Sujeción con restricción de movimiento (inmovilización)	26
MÉTODOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ROEDORES DE LABORATORIO	30
Métodos no permanentes	30
Métodos permanentes	31
SEXADO DE RATAS Y RATONES	32
CICLO ESTRAL Y CITOLOGÍA VAGINAL	33
Procedimiento de ciclado	35
BIBLIOGRAFÍA	36

BIOTERIO

Se denomina así a la estructura física y organizacional destinada a la cría y mantenimiento de los animales de laboratorio.

El Bioterio de la UNSL, con más de tres décadas de operatividad, tiene como objetivo facilitar animales definidos y estandarizados, necesarios en investigaciones científicas y en la práctica docente. Su predio presenta una superficie total de 1714 m² (**Figura 1**) y, tal como lo establece el DT-6344/96 de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), su estructura edilicia de corredor único cuenta con: locales de producción, locales de mantenimiento y salas de experimentación, todas con sistemas de aire acondicionado y ventilación no compartidos con otras áreas; sala de cirugía; área de lavado; área de depósito de material limpio y de alimento. Además, cuenta con una oficina (recepción), personal capacitado (médico veterinario, técnicos y personal no docente) y equipos especializados: autoclave, cabina de flujo laminar, sistema de racks ventilados, cámara de dióxido de carbono, relojes temporizadores programables.



Figura 1. Bioterio de la FQByF-UNSL. Fuente: Prensa FQByF, 2017.

Desde el año 2017 se encuentra adherido al Sistema Nacional de Bioterios (SNB), que tiene como propósito optimizar el estado, funcionamiento y prestación de servicios de los bioterios que alojan animales de laboratorio en todas sus categorías (cría, experimentación, ensayo biológico, docencia), que se encuentren instalados en instituciones del sistema académico y científico argentino.

Normas de higiene y seguridad

Las personas que soliciten animales de laboratorio (investigadores, docentes, becarios), deben: 1) conocer la naturaleza de la investigación o práctica a realizar; 2) comprender las características generales y condiciones óptimas de mantenimiento de la especie solicitada, fundamentalmente si el experimento es crónico, pues serán responsables del cuidado de los animales asignados a través del protocolo aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la UNSL (disponible en: <http://www.fgbf.unsl.edu.ar/cicua.html>); 3) conocer las instalaciones del bioterio y su correcto uso.

Entre las normas de higiene y de seguridad más importantes se puede mencionar:

- Sólo personal autorizado podrá ingresar al bioterio.
- Utilizar elementos de protección personal (EPP) (guardapolvo largo, cofia, guantes y barbijo) dentro del bioterio (**Figura 2**), los cuales deben colocarse en la zona de vestuario. Es importante el cuidado de la vestimenta del personal, la cual debe cubrir extremidades y pies por completo (pantalón largo y zapatos cerrados). Las gafas de seguridad deben usarse cuando el procedimiento de investigación lo requiera. Finalizado el trabajo, los EPP descartables deben depositarse dentro de bolsas de polietileno de color rojo de 120 micrones de espesor.



Figura 2. Uso adecuado de elementos de protección personal (EPP) en bioterio. Fuente: Bioterio-UNSL, 2021.

- No utilizar perfumes, colonias o productos cosméticos con fragancias intensas cuando trabaje con animales, ya que pueden interferir con el bienestar animal.
- Conocer la localización del botiquín de primeros auxilios y rutas de evacuación ante una emergencia.

- Contar con vacuna antitetánica y contra la hepatitis B.
- Informar al responsable principal del protocolo si se padece de problemas respiratorios (asma), neurológicos o alergias.
- No comer, beber, fumar, ni llevar nada a la boca mientras permanezca en el bioterio.
- Trabajar generando el menor ruido posible para minimizar el estrés ocasionado a los animales.
- Mantener el área de trabajo limpia.
- Rotular correctamente las jaulas utilizadas.
- En la puerta de la sala de experimentación designada, colocar la información más relevante: N° de protocolo CICUA aprobado, título del protocolo, fecha de inicio y finalización del experimento, especie animal, posibles riesgos para el personal o para la población animal del bioterio, número de teléfono de la persona responsable.
- Informar inmediatamente al Director del Bioterio cualquier accidente.
- Eutanazar todo animal encontrado libre, fuera de una caja o jaula.
- Conocer los procedimientos normalizados de limpieza y desinfección de materiales e instalaciones, conjuntamente con los flujos adecuados de personal y material.

Limpieza y desinfección

Se entiende por “limpieza” a la acción y efecto de remover todo material extraño de una superficie mediante métodos físicos y/o químicos, mientras que “desinfección” se define como el procedimiento destinado a destruir los agentes patógenos para los animales y las personas, aplicado a los locales e implementos utilizados en el establecimiento. A diferencia de la desinfección, la “esterilización” es el procedimiento utilizado para eliminar toda forma de vida microbiana (incluso a las esporas) y virus.

La frecuencia e intensidad de los procedimientos dependerá de las necesidades para brindar al animal un medio ambiente saludable, de acuerdo a sus características fisiológicas y conducta normal. Los métodos sanitarios y frecuencia varían según: tamaño, tipo y propiedades físicas del encierro; las características de los materiales del lecho; la rapidez con la que se ensucian las superficies del encierro; tipo, número, tamaño, edad y condición reproductiva de los animales; la temperatura y humedad relativa. Algunos sistemas de alojamiento o protocolos experimentales pueden requerir técnicas de manejo específicas, tales como la manipulación aséptica.

Recomendaciones generales

- Primero se debe realizar la limpieza y luego la desinfección.
- La limpieza debe ser húmeda, se prohíbe el uso de plumeros, lampazos, elementos que movilicen el polvo ambiental.
- Las soluciones de detergentes y los agentes desinfectantes como hipoclorito de sodio, amonios cuaternarios y otros, deben prepararse inmediatamente antes de ser usados y descartados a diario.
- El detergente no debe mezclarse con productos clorados, ya que se podrían generar vapores tóxicos e irritantes para el tracto respiratorio, entre otros efectos, y, además, se inactiva la acción microbicida.
- Cada sector debe contar con su propio equipo de limpieza que no debe ser utilizado en otros sectores.
- La limpieza debe comenzar desde el área más limpia, terminando con el área más sucia y desde las áreas más altas a las más bajas. Así, se reduce el riesgo de contaminar las superficies del área limpia.
- No deben usarse agentes que enmascaran olores (por ejemplo, desodorantes de ambiente o piso) en las instalaciones que se utilizan para albergar animales. No pueden sustituirse las buenas prácticas de sanidad o ventilación adecuada y tampoco exponer a los animales a compuestos volátiles que podrían modificar los procesos fisiológicos y metabólicos básicos.

Breve descripción de procedimientos

- 👉 PAREDES: para facilitar su limpieza, es importante que sean uniformes, impermeables, lisas y no presenten grietas. La limpieza debe realizarse de acuerdo a calendarización (por lo menos una vez cada dos semanas), con los aditamentos necesarios en tres tiempos, el primer y segundo tiempo realizarlo con agua potable, el tercer tiempo realizarlo con el desinfectante asignado al área. Si es necesario remover manchas y suciedad rebelde, antes de la desinfección se puede utilizar un detergente no iónico. Recuerde no mezclar detergente con lavandina y no utilizar soluciones aromatizantes.
- 👉 ESTANTERÍAS: proceder de igual forma que con las paredes. Tener presente que las soluciones de lavandina y yodopovidona son oxidantes y causan daños a los metales, excepto que sea acero inoxidable.

- 👉 VENTANAS: rociar el vidrio con una solución de detergente y cepillar utilizando un cepillo humedecido de cerdas blandas. Luego de enjuagar utilizando un trapo embebido en agua limpia, rociar el vidrio con lavandina diluida al 4%. Finalmente, enjuagar con agua limpia y secar con papel.

- 👉 PUERTAS: humedecer un paño con lavandina diluida al 4% y limpiar friccionando. Luego, enjuagar y dejar secar.

- 👉 PISOS: al igual que las paredes, para facilitar la limpieza es importante que los pisos sean uniformes, impermeables, lisos y no presenten grietas. Primero, se debe realizar el barrido mecánico de los sólidos utilizando un cepillo humedecido o envuelto con un trapo húmedo, para no levantar polvo ni provocar la dispersión de partículas ambientales. Luego, realizar una limpieza enérgica empleando un detergente. El método de limpieza más apropiado es el de vía húmeda de doble trapo y doble balde (balde A y balde B). El balde A debe contener una solución de detergente de 100 cm³ por cada 10 L de agua (al 1%) y el balde B debe contener agua potable para enjuagar. Siempre debe limpiarse desde la zona más limpia a la más sucia y el agua de los baldes se debe ir cambiando a medida que se vea visiblemente sucia. Para la desinfección, otro balde debe contener una dilución de lavandina al 4%, donde se embeberá otro paño que luego se frotará en el piso. Es recomendable realizar este procedimiento de manera diaria. Esta forma de proceder es la correcta, la más eficaz y la más económica. Recuerde no utilizar soluciones con aroma. Cuando deban limpiarse sectores con cableado eléctrico en el piso, se debe tener la precaución de cortar el suministro eléctrico y desconectar los aparatos teniendo en cuenta si la desconexión de los mismos es posible. Ante un plan programado de limpieza, los empleados mismos del bioterio deben contribuir a la desconexión de los equipos y enrollamiento de los cables para facilitar las tareas de limpieza.

- 👉 MOBILIARIOS DE OFICINA: realizar la limpieza con una solución jabonosa o detergente mediante el uso de un paño o rejilla humedecida. Para la desinfección, utilizar alcohol medicinal de 75° que se aplicará con rejilla o paño humedecido o rociador (para ello, mezclar 3 partes de alcohol medicinal de 95° con una parte de agua potable).

- 👉 **MESADAS DE TRABAJO Y MESAS DE ACERO INOXIDABLE PARA CIRUGÍA:** si estuviesen contaminadas con gérmenes nocivos, es importante desinfectarlas utilizando una solución de lavandina al 10%, dejándola actuar 30 minutos como mínimo. No se deben dejar restos de hipoclorito activo cuando personas puedan tomar contacto inmediato con él y dañarse por sus efectos decolorantes o cáusticos. En presencia de heces, o fluidos corporales como sangre u orina, primero deben recolectarse con ayuda de papel absorbente, que se descartará como “residuo patológico” dentro de bolsas de polietileno de color rojo de 120 micrones de espesor, precintadas y rotuladas. Luego, se podrá continuar con la limpieza (empleando una solución de agua y detergente), enjuague (con un trapo embebido en agua limpia) y desinfección (con un trapo rejilla embebido en solución clorada).

- 👉 **CAJAS O JAULAS DE ANIMALES:** los lechos sucios deben ser vaciados de las cajas o jaulas fuera de los locales con animales, y dentro de bolsas rojas de 60 micrones de espesor, de forma tal que se evite la dispersión excesiva de partículas en el ambiente, lo que resultaría perjudicial para el personal y los animales. Luego colocar estas bolsas dentro de otras bolsas rojas de polietileno de 120 micrones de espesor. Las cajas deben ser lavadas utilizando agua, detergente y esponja (o escobilla). Luego, se deben desinfectar con agua caliente (61,7-82,2 °C o superiores) o con lavandina diluida al 5% durante 20 minutos como mínimo. Si el material de la caja es autoclavable, se puede esterilizar. Una vez seca, se puede agregar el material de lecho limpio.

- 👉 **FRASCOS BEBEDEROS Y PICOS:** Toda la superficie interna de los bebederos se lavará con agua, detergente y cepillo limpia botellas. De manera similar se procederá con los picos, utilizando un limpiador de pipa. Luego de enjuagarlos, desinfectarlos con agua caliente o con algún desinfectante como lavandina al 5%, sumergiendo el bebedero y pico durante 30 minutos como mínimo. Si se utiliza lavandina, los bebederos se deben enjuagar finalmente con abundante agua.

- 👉 **DESINFECCIÓN DE INSTRUMENTAL METÁLICO:** para desinfectar los instrumentos metálicos, primero hay que sumergirlos en una solución alcohólica de 50° con glutaraldehído al 1% o una solución alcohólica de 70° conteniendo el 5% de solución de yodopovidona al 10%. En todos los casos dejar actuar 2 horas y luego enjuagar con agua esterilizada. Tener presente que las soluciones de

lavandina y yodopovidona son oxidantes y causan daños a los metales, excepto que sea acero inoxidable.

- 👉 **DESINFECCIÓN DE INSTRUMENTAL NO METÁLICO:** para desinfectar los instrumentos médicos no metálicos, luego de lavarlos, sumergirlos durante al menos 30 minutos en solución acuosa de glutaraldehído al 2% alcalino, o mezcla de 1 volumen de solución de yodopovidona 10% + 1 volumen de agua, o alcohol de 70° con 25% de solución de yodopovidona 10%. Para desinfectar objetos de cuero o goma, frotarlos con un paño embebido en solución jabonosa de cloroxilenol diluida al 3%. Tener presente que el cloro de la lavandina y el yodo de la yodopovidona reaccionan con materiales de cuero y goma y los degradan. Para la desinfección de guantes de goma, primero hay que lavarlos con una solución de agua y detergente y luego sumergirlos en solución de clorhexidina al 0,5%, o solución de glutaraldehído al 2%, durante 30 minutos.

- 👉 **LAVADO DE MANOS:** debe respetarse el procedimiento de lavado de manos recomendado por la Organización Mundial de la Salud (**Figura 3**), utilizando un jabón líquido que contenga clorhexidina.



Figura 3 ¿Cómo lavarse las manos? Fuente: Organización Mundial de la Salud, 2009.

Sobre los productos para tareas de limpieza y desinfección:

Deben estar contenidos en envases limpios, sanos y secos. Cuando muestren signos de deterioro, deben ser reemplazados por otros nuevos.

- **Detergentes:** Una solución de detergente biodegradable típica comercial del 10% (de dodecil benceno sulfonato de amonio), debe disolverse en una dilución de 1 L por cada 100 L de agua, o partes proporcionales, o de 100 cm³ por cada 10 L de agua. Si el detergente fuera del 20% usar la mitad y si fuera del 30% usar la tercera parte. Esta disolución del 1% respecto del producto original, basta para garantizar una buena limpieza sin derroche.

- **Lavandina:** el producto comercial posee en la actualidad 55 g de cloro activo por litro, que corresponde a las buenas marcas (Resoluciones de la ANMAT). Es la llamada solución de hipoclorito sódico concentrada. A los fines prácticos de los cálculos de dilución en porcentaje, se debe tomar hipotéticamente a la solución concentrada comercial como del 100%. Es muy importante partir de un agua lavandina de buena marca y calidad, producto comercial que debe provenir de una empresa inscrita en la ANMAT. El vencimiento del agua lavandina comercial es de 4 meses a partir de su elaboración. Además, se vence a mayor velocidad por el efecto del calor (principalmente en verano) y por la acción de la luz intensa. Por consiguiente, se aclara que la lavandina debe permanecer almacenada al abrigo de la luz o en envase opaco, en lugar fresco y en envase cerrado.

Para preparar, por ejemplo, una solución de lavandina al 4%, diluya 40 mL o cm^3 (6 cucharadas) de lavandina concentrada en 1 L de agua potable. Para la mayoría de las desinfecciones, se recomienda esta dilución, dejando actuar al menos 20 minutos. Todas las diluciones de lavandina deben prepararse en el momento de su uso y utilizarse en un plazo no superior a 30 horas (son extemporáneas, es decir, pierden su principio activo). Recuerde que es muy importante que la lavandina actúe sola, sin presencia de detergente u otros productos de limpieza o desinfección, porque pueden generar la liberación de cloro, que a su vez puede ser un irritante cáustico, y la lavandina pierde su poder germicida. Las soluciones de lavandina del 2% al 4% son microbicidas contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, hongos, levaduras, parásitos y virus. Las esporas bacterianas y fúngicas requieren concentraciones más altas, por lo que debe usarse directamente una dilución al 10%. Para ello, disuelva una parte de lavandina en 9 partes de agua corriente. Se debe tener cuidado de dejar actuar esta solución durante al menos 30 minutos en estrecho contacto con los residuos o las superficies a tratar. Luego proceda a un enjuague a fondo con abundante agua.

Las soluciones de lavandina son muy cáusticas y alcalinas debido a que contienen soda cáustica libre (hidróxido de sodio) para estabilizar al hipoclorito. Por ello, se recomienda llevar guantes y gafas al utilizarla: guantes, porque es muy dañina para la piel (la saponifica), y gafas, como protección contra salpicaduras en el rostro, porque es muy nociva para la conjuntiva (la ulcera). En general es muy perjudicial para todas las partes mucosas y tejidos blandos del cuerpo.

- **Alcohol medicinal (etanol 96%):** tiene propiedades bactericidas, fungicidas y virucidas, pero no destruye las esporas bacterianas. Para ello, no debe diluirse por

debajo del 50% de concentración. La concentración bactericida óptima está en un rango entre 60 y 90%.

- **Glutaraldehído:** es un dialdehído saturado que ha ganado una amplia aceptación como desinfectante de alto nivel y esterilizante químico. Las soluciones acuosas de glutaraldehído son ácidas y generalmente en este estado no son esporicidas. Solo se vuelve esporicida cuando la solución se "activa" a un pH de 7,5 a 8,5 mediante el uso de agentes alcalinizantes. Una vez activadas, estas soluciones tienen una vida útil de 14-28 días. El glutaraldehído no es corrosivo para el metal y no daña instrumentos con lentes, caucho o plásticos. No debe usarse para limpiar superficies no críticas porque es demasiado tóxico y costoso.
- **Yodopovidona:** solución de povidona y yodo molecular, generalmente en un 10%, empleada frecuentemente como desinfectante y antiséptico (sustancia que inhibe el crecimiento o destruye microorganismos sobre tejido vivo). Es eficaz contra bacterias Gram positivas y negativas, esporas, hongos, protozoos y virus. Posee excelente perfil de seguridad, pero está contraindicado en pacientes con hipersensibilidad al yodo o medicamentos iodados. Es estable a temperatura ambiente. Su actividad microbicida se mantiene en presencia de sangre, pus, suero y tejido necrótico.
- **Cloroxilenol:** desinfectante y antiséptico que no se afecta significativamente por la materia orgánica. Si bien es un producto eficaz sobre un amplio espectro de bacterias Gram positivas, es menos eficaz sobre bacterias Gram negativas, y suele ser ineficaz sobre *Pseudomonas* e inactivo sobre endosporas.
- **Clorhexidina (digluconato de clorhexidina):** desinfectante y antiséptico. Sus principales ventajas son su rápida acción germicida y su efecto residual prolongado (entre 6 y 48 horas). Es efectivo contra bacterias (especialmente Gram positivas), virus envueltos (como pueden ser el virus respiratorio sincitial, el virus de la influenza, el VIH, el virus del herpes simple o el citomegalovirus) y la clorhexidina al 2% es activa frente a algunos hongos. Su absorción a través de la piel es mínima, y, si se absorbe, la eliminación es renal o a través de la bilis, sin metabolitos intermedios.

ÉTICA EN EL USO DE ANIMALES

Los animales de laboratorio se definen generalmente como cualquier animal (es decir, animales de laboratorio tradicionales, animales agrícolas, de la fauna silvestre y especies acuáticas) utilizado en investigación científica, enseñanza superior y pruebas de control. Entre ellos se encuentran: ratas, ratones, conejos, cobayos, primates no humanos, cerdos, vacas, cabras, ovejas, equinos, gatos, perros, aves, reptiles, anfibios, peces, etc.

Los animales de laboratorio son seres sensibles, que experimentan dolor. Por consiguiente, es importante manipularlos de manera adecuada para incrementar el bienestar animal, disminuir el estrés, evitar alteraciones en las pruebas o repeticiones innecesarias y obtener resultados válidos y reproducibles.

En este sentido, los comités institucionales para el cuidado y uso de animales de experimentación (abreviados como CICUAE, CICUAL o CICUA) tienen el rol de garantizar que las actividades que involucran animales de experimentación se rijan por la normativa internacional y nacional, el principio de las 3R y un balance ético a favor del bienestar.

Cada CICUAE analiza los protocolos de investigación en línea con el cumplimiento de los principios básicos referidos al trato ético y humanitario de los animales como modelos experimentales. Evalúan, especialmente, la relación entre beneficios que pretende lograr la investigación y los daños a los animales y los criterios de retiro humanitario anticipado del ensayo y eutanasia, en virtud de considerar las normas internacionales.

Entre los requisitos, estas comisiones solicitan que los proyectos científicos adjunten un detalle de los métodos que se utilizarán para disminuir o paliar el dolor producido durante los procedimientos. Esto implica la descripción de las drogas analgésicas y anestésicas a suministrar, con la indicación de dosis y frecuencia de administración.

Asimismo, tienen la función de procurar la formación especializada de los investigadores que manipulan animales, la participación –o supervisión– de un veterinario o especialista en la especie animal que se emplea en los procedimientos experimentales y el acondicionamiento de bioseguridad de las instalaciones.

Principio de las tres Rs

Se puede decir que la investigación en animales es éticamente aceptable, si se sigue el principio de las tres Rs propuesto por William Russell (zoólogo y psicólogo) y Rex Burch (microbiólogo) en su libro “*The Principle of Humane Experimental Technique*”, en el año 1959: **Reemplazar, Reducir y Refinar.**

 El **reemplazo** se refiere a la búsqueda de alternativas adecuadas que eviten el uso de animales. El término incluye reemplazos absolutos (es decir, reemplazar animales con sistemas inanimados como programas de computadora) así como reemplazos relativos (es decir, reemplazar animales vertebrados con animales menos complejos desde el punto de vista celular).

 La **reducción** implica estrategias para obtener niveles comparables de información a partir del uso de menos animales o para maximizar la información obtenida de un número determinado de animales (sin aumentar el dolor o la angustia) de modo que, a la larga, se necesiten menos animales para adquirir la misma información científica. Este enfoque requiere un buen trabajo en el diseño experimental, controlando la variabilidad relacionada con el micro y macroambiente en las áreas de estudio y alojamiento de los animales, el uso de métodos estadísticos adecuados y promover la publicación de resultados negativos para evitar repeticiones. La reducción no debe ser una razón fundamental para reutilizar un animal o animales que ya se han sometido a procedimientos experimentales, especialmente si el bienestar de los mismos se ve comprometido.

 El **refinamiento** se refiere a modificaciones de los procedimientos experimentales o de cría para mejorar el bienestar animal y minimizar o eliminar el dolor y la angustia. Por ejemplo, comprende promover la aplicación de técnicas que permitan procesar muestras cada vez más pequeñas y, consecuentemente, lesionar menos al animal.

En el año 2006, Georgina Díaz y Lucía Brito, del Bioterio y de la Biblioteca del Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", respectivamente, publicaron en Gaceta "Biomédicas" una serie de recomendaciones tendientes a afianzar la adherencia a las tres Rs:

- a) *Definir y controlar las condiciones de mantenimiento de los animales en experimentación por parte de un veterinario.*
- b) *Debe existir una probabilidad razonable para que los estudios que utilizan animales contribuyan de manera importante a la adquisición de conocimientos.*
- c) *Los métodos estadísticos, los modelos matemáticos y los sistemas biológicos in vitro deben ser utilizados cuando sean apropiados para completar la experimentación animal y reducir así el número de los sujetos utilizados.*
- d) *El experimentador debe utilizar el animal mejor adaptado a su investigación (especie, cepa, sexo, edad o peso) y tener en cuenta los grados sensoriales y psíquicos propios de cada especie.*
- e) *El experimentador tiene el deber de evitar al animal todo sufrimiento físico o psíquico inútil. Debe poner en marcha los métodos que permitan disminuir el sufrimiento y el dolor, en el caso de que sea inevitable, y considerar adelantar el punto final del experimento.*

En este nuevo siglo se terminó consagrando una "R" adicional, el **Reciclaje**. Vale decir utilizar a los animales más de una vez, para fines investigativos distintos o bien de otra naturaleza.

RATAS Y RATONES

Características generales

Las ratas y los ratones de laboratorio representan entre el 80 y 90% de la demanda para experimentación por presentar las siguientes *ventajas*:

- Tamaño pequeño.
- Los bajos costos de manutención.
- Se adaptan muy bien a la producción en cautiverio.
- Diversidad de características específicas que sirven como modelo.
- Altos índices reproductivos (3 semanas de gestación y 6-12 crías por camada).
- Corto tiempo de generación.
- Por su vida relativamente corta es excelente para su uso en ensayos crónicos de toxicología, microbiología, virología, farmacología, etc.

Sin embargo, estos animales también presentan algunas *desventajas*:

- Dificultad en la recolección de material biológico.
- Dificultad en la administración de sustancias (debe ser realizada por personal capacitado).
- Dificultad en las técnicas quirúrgicas, debido a su tamaño.

Entre otras características importantes de los roedores se encuentran:

- ✓ Son mamíferos de sangre caliente y de hábitos nocturnos.
- ✓ Poseen un agudo sentido de la audición, por lo que se alteran rápidamente con los ruidos.
- ✓ El sentido del olfato está muy desarrollado. Por tanto, los operadores no deben utilizar perfumes, desinfectantes que desprendan olores y aromatizantes de ambiente en las instalaciones de un bioterio. El olfato ayuda a los roedores a detectar alimentos y depredadores, encontrar parejas sexualmente activas, percibir un orden social, entre otras cosas.
- ✓ Su visión es muy pobre y no pueden percibir los colores. En la órbita del ojo se encuentran las glándulas Harderianas que excretan porfirina en situación de estrés.
- ✓ Son animales dóciles.
- ✓ Son muy susceptibles a los cambios ambientales.

- ✓ Las hembras son poliéstricas continuas, es decir, sus ciclos reproductivos se repiten continuamente a lo largo del año y se interrumpen solo en la preñez.
- ✓ Tienen una vida útil de 8 a 12 meses y se obtienen de 8 a 10 camadas por pareja.

Las principales diferencias reproductivas entre la rata y el ratón son:

	
<p style="text-align: center;">RATA</p> <ul style="list-style-type: none"> -Primer ciclo fértil a los 77 días. -Machos con capacidad reproductiva a los 50-60 días. -Final de la reproducción: 10-12 meses. -Gestación: 21-23 días. 	<p style="text-align: center;">RATÓN</p> <ul style="list-style-type: none"> -Primer ciclo fértil a los 75 días. -Machos con capacidad reproductiva a los 45-55 días. -Final de la reproducción: 8-10 meses. -Gestación: 19-21 días.

Las especies y cepas consanguíneas de ratas y ratones reproducidos y mantenidos en el Bioterio de la UNSL son (**Tabla 1**):

Tabla 1. Ratas y ratones presentes en el Bioterio de la UNSL.

Especie	Cepa	Información
<i>Mus musculus</i>	Balb/c	<ul style="list-style-type: none"> • Albino • Camada promedio: 6 • Stock adquirido por H. Bagg en 1913 y por lo tanto llamado "<i>Bagg albino</i>" o BALB. • Usos frecuentes: oncología, toxicología, trasplante, envejecimiento, estudios generales, teratología, producción de anticuerpos, farmacología, biología cardiovascular. • Recursos técnicos: https://www.envigo.com/model/balb-colahsd
<i>Mus musculus</i>	C57BL/6	<ul style="list-style-type: none"> • Negro • Camada promedio: 5

	C57BL/6 TNFRp55 knockout (deficiente en el receptor Tipo 1 de TNF- α)	<ul style="list-style-type: none"> • Usos frecuentes: inmunología, genética, oncología, toxicología, envejecimiento, estudios generales, comportamiento, biología cardiovascular, neurociencia, diabetes y obesidad. • Recursos técnicos: https://www.envigo.com/model/c57bl-6jolahsd <p>Obtenido de Max von Pettenkofer-Institute (Munich, Germany). Estos ratones genéticamente modificados muestran expresión normal de TNFRp75 en sus células. El desarrollo de timocitos y poblaciones de linfocitos es normal. Sin embargo, muestran importantes deficiencias en la señalización en respuesta a TNF-α en procesos inflamatorios y de defensa del huésped frente a infecciones.</p>
<i>Rattus norvegicus</i>	Holtzman	<ul style="list-style-type: none"> • Albina • Camada promedio: 11 • Desarrollada en 1947 por Holtzman Company en Madison, Wisconsin, a partir de Sprague Dawley®. • Usos frecuentes: oncología, teratología, estudios generales, toxicología, neurología, reproducción. • Recursos técnicos: https://www.envigo.com/model/hsdhot-holtzman-sd-
<i>Rattus norvegicus</i>	Wistar	<ul style="list-style-type: none"> • Albina • Camada promedio: 9.5 • Desarrollada en el Instituto Wistar, Filadelfia, Pensilvania, en 1906. • Usos frecuentes: oncología, teratología, estudios generales, nutrición, envejecimiento. • Recursos técnicos: https://www.envigo.com/model/hsd-wi

Manejo y cuidado básico

Diferentes factores del micro- y macro-ambiente pueden afectar a los animales:

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

El microambiente de los animales de laboratorio

También llamado encierro primario, es el ambiente físico inmediato que rodea al animal, conformado por: la caja o jaula, el lecho, el alimento, el agua, así como el mantenimiento de las condiciones de higiene de cada uno de ellos y la temperatura, humedad y la composición gaseosa y particulada del aire, que puede diferir mucho respecto del macroambiente.

CAJAS O JAULAS

Los animales deben alojarse en cajas o jaulas en buen estado (para evitar escapes o lesiones), especialmente diseñadas para facilitar su bienestar. Las cajas pueden ser de metal, de polipropileno o policarbonato, con paredes y pisos fáciles de limpiar (superficies lisas), provistas de tapas de acero inoxidable. Para ratas, también pueden utilizarse jaulas totalmente en alambre AISI 304, con bandeja colectora del mismo material. Sin embargo, los alojamientos sobre piso sólido y material de cama son preferidos por los roedores. Ambas opciones deben proveer acceso fácil a la comida y bebida, permitir la observación de los animales contiguos con la mínima molestia para ellos, contar con adecuada ventilación y ser resistentes al lavado, la desinfección y la esterilización frecuente. Además, deben permitir movimientos y adopciones de posturas normales al animal, preservando a su vez las condiciones mínimas de higiene y de protección contra amenazas externas.

El número de animales por jaula se definirá en relación al tamaño corporal, evitándose la sobrecarga. En la siguiente tabla (**Tabla 2**) se muestran las recomendaciones del espacio asignado a roedores alojados en grupos:

Tabla 2. Espacio recomendado para roedores de laboratorio alojados en grupo. Fuente: INTA.

Animal	Peso corporal (g)	Área del piso/animal (cm ²)	Altura mínima de piso a techo (cm)
Ratón	<10	38,71	12,7
	10-15	51,61	
	Hasta 25	77,42	
	>25	96,77	
Rata	<100	109,68	17,78
	100-200	148,39	

	Hasta 300	187,1	
	Hasta 400	258,1	
	Hasta 500	387,1	
	>500	451,61	

LECHO O CAMA

El material de cama de los animales es un factor controlable del medio ambiente, que puede influir en su bienestar y en los resultados experimentales. Por ello, deben utilizarse materiales absorbentes, libres de sustancias químicas tóxicas que puedan dañar a los animales y/o interferir en las respuestas biológicas.

Se recomienda utilizar virutas de madera blanca, no resinosa, y evitar lechos que pudieran ser fácilmente ingeridos. También se recomienda la esterilización de los lechos ya que, dependiendo de las características de su origen, generalmente están contaminados con gérmenes patógenos de roedores salvajes u otros animales. Sin embargo, durante la esterilización en autoclave el material para lechos puede absorber humedad, lo que resulta en una menor capacidad de absorción y favorece el crecimiento de microorganismos. Por lo tanto, deben darse tiempos de secado y condiciones de almacenamiento adecuados.

El cambio de caja, la renovación de lechos y el retiro de las excretas deberán tener una periodicidad tal que impida la acumulación de amoníaco y otras sustancias o elementos perjudiciales, permitiendo que los animales se mantengan limpios y secos. La frecuencia del cambio depende del criterio profesional del personal a cargo del cuidado de los animales, de acuerdo con el investigador responsable, en consideración de factores tales como: el tamaño y número de animales por caja, la producción de heces y orina, la apariencia y grado de humedad de la cama, las condiciones experimentales, entre otras cosas.

ALIMENTACIÓN

Los animales deben ser alimentados con dietas apetitosas, no contaminadas y nutricionalmente adecuadas (**Figura 4**), diariamente o de acuerdo con sus necesidades particulares, a menos que el protocolo en el que se estén utilizando requiera lo contrario.

Los directivos del Bioterio deben extremar los cuidados al comprar, transportar, almacenar y manipular los alimentos para minimizar la introducción de enfermedades, parásitos y plagas, y contaminantes químicos a las colonias animales.



Figura 4. Ejemplo de una marca comercial de alimento balanceado para roedores. Fuente: <http://www.hgilardoni.com.ar/alimentosycajas.htm>

PROVISIÓN DE AGUA

Diariamente, los animales deben tener acceso al agua potable estéril y de acuerdo a sus necesidades particulares.

Los bebederos (de vidrio o policarbonato) y los picos (preferentemente de acero inoxidable) deben ser revisados diariamente para verificar su adecuado mantenimiento y limpieza. Se recomienda lavar ambos (bebederos y picos) al menos 2 veces por semana. Además, se recomienda que el agua sea renovada diariamente y que los bebederos no sean simplemente recargados.

El macroambiente de los animales de laboratorio

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

La alteración de factores macroambientales puede impactar el modelo animal y, con ello, modificar el tipo de respuesta, además de incrementar la variabilidad de los resultados entre o dentro de los laboratorios de experimentación.

AIRE Y VENTILACIÓN

Por tratarse de un bioterio con pasillo único, los ambientes destinados a la producción de animales y las salas de experimentación deben poseer ventilación con presión positiva de aire en su interior respecto a los pasillos o áreas exteriores, para evitar el ingreso de patógenos.

La provisión de 10 a 15 cambios de aire fresco por hora en las salas de alojamiento de animales es una pauta aceptable para controlar la humedad, el calor y la acumulación de amoníaco. Sin embargo, se debe tener en cuenta que este rango, si bien es eficaz en muchos entornos de alojamiento de animales, no tiene en cuenta las posibles cargas de calor, el tamaño y número de animales involucrados; el tipo de recinto primario y material de lecho, la frecuencia de cambio de jaula, las dimensiones de la habitación, o la eficiencia de la distribución del aire tanto en el macroambiente como entre el macroambiente y el microambiente.

La percepción de amoníaco en el ambiente suele indicar saturación del lecho, por lo que se recomienda, además de la ventilación, tener programas periódicos de limpieza según la población que se maneje.

TEMPERATURA Y HUMEDAD

Según la ANMAT, la temperatura para los roedores de laboratorio debe mantenerse entre 18-22 °C y la humedad relativa entre 40-70%. Según la *National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* la temperatura macroambiental debe permanecer entre 20-26 °C para ratas y ratones, y el rango aceptable de humedad relativa es del 30% al 70% para la mayoría de las especies de mamíferos.

Las condiciones ambientales en las que se crían los animales y se llevan a cabo los experimentos influyen de forma decisiva en las respuestas a los diferentes tratamientos. Si se requieren respuestas estandarizadas, se deben fijar las condiciones en las que se mantienen los animales. Por eso, es importante que cada habitación cuente con un sistema de ventilación y aire acondicionado no compartido con otras áreas.

INTENSIDAD DE LUZ Y TIPO DE ILUMINACIÓN

Las habitaciones deberán contar con luz artificial, provistas de lámparas fluorescentes tipo luz diurna, de incidencia oblicua, con una iluminación máxima de 300-325 lux a un metro del piso; de modo que todas las jaulas, independientemente de su ubicación, reciban intensidades de luz similares. Estos niveles de luz parecen ser suficientes para el cuidado de los animales y no causan signos clínicos de fototoxicidad retinal en ratas albinas.

La luz puede afectar la fisiología y comportamiento de los animales. Por consiguiente, los ciclos de luz/oscuridad deben regularse automáticamente y se recomiendan 12 h de luz y 12 h de oscuridad, a menos que un protocolo de experimentación justifique un cambio (ejemplo: estudios cronobiológicos).

RUIDO

Los roedores son muy sensibles al ruido y pueden percibir frecuencias de sonido que son inaudibles para los humanos, por lo que el personal debe tratar de minimizar la generación de ruido innecesario. No deben utilizarse radios, teléfonos celulares, alarmas u otros generadores de sonido en las habitaciones donde se alojan animales. Tampoco pueden utilizarse auriculares conectados a aparatos receptores o reproductores de sonido.

Se permite un nivel máximo de ruido de 85 decibeles (dB). La exposición a sonidos superiores a 85 dB provoca efectos negativos en los animales, como eosinopenia, aumento de peso de las glándulas suprarrenales y problemas reproductivos.

TÉCNICAS DE SUJECIÓN

Para realizar cualquier técnica de sujeción de animales, es importante que el operario use guantes de tamaño exacto a la mano, barbijo, guardapolvo, cofia y esté inmunizado contra el tétanos y la hepatitis B.

Una buena técnica de sujeción permite llevar a cabo los procedimientos de traslado de jaula (por ejemplo, durante el cambio de lecho o destete de crías), sexado y ciclado, administración de sustancias o toma de muestra de la forma adecuada, provocando el menor estrés en el animal.

Manipulación de ratas y ratones para el traslado a otra jaula

Para el traslado de RATAS, se tomará al animal por el dorso rodeándolo con la mano de manera firme pero suave (**Figura 5**). Si el animal es más grande que la mano del operario, se debe dar apoyo a los cuartos traseros para evitar que se incomode y caiga.



Figura 5. Manipulación de una rata adulta para el traslado a otra jaula. Fuente: Bioterio-UNSL, 2021.

Para el traslado de RATONES, se sujetará al animal de la base de la cola con los dedos índice y pulgar (**Figura 6**). Otra forma es abrazándolo del cuello con el dedo índice y el pulgar.



Figura 6. Manipulación de un ratón adulto.

Fuente: Bioterio-UNSL, 2021.

Manipulación de crías

RECIÉN NACIDOS:

En general, no se aconseja manipular crías recién nacidas porque la madre podría desconocer el olor que le dejamos impregnado y matarlos, o dejarlos fuera de la camada sin alimentarlos.

En el caso de traslado de jaula, se debe pasar primero a la madre y luego a las crías. Los recién nacidos deben ser tomados todos a la vez (**Figura 7**) y, de manera rápida, pero suave y tranquila, deben ser depositados en la jaula donde está la madre.



Figura 7. Manipulación de crías recién nacidas. Fuente: Bioterio-UNSL, 2021.

CRÍAS DE 3 A 9 DÍAS:

A partir de los 3 días de edad las crías son más movedizas. Por consiguiente, se recomienda tomarlas con dos dedos desde la parte media del cuerpo, ejerciendo sólo la presión necesaria para sujetarlas y trasladarlas una a una.

CRÍAS DE 10 A 21 DÍAS:

En el caso de las crías con pelo, a partir de los 10 días de nacidas y hasta el día 21 (momento del destete) se deben tomar de la misma forma que el caso anterior. Aquí se tiene la ventaja de tener más piel para sujetarlas (**Figura 8**).



Figura 8. Manipulación de una cría de ratón de 14 días. Fuente: Bioterio-UNSL, 2021.

Sujeción con restricción de movimiento (inmovilización)

Inmovilizar físicamente a una rata o ratón de laboratorio significa restringir sus movimientos, poner una barrera, en este caso física, que impida al animal moverse. Para ello, existen diferentes maniobras que deben realizarse evitando ruidos innecesarios, movimientos bruscos y temor.

RATAS:

Un método de uso habitual para la inmovilización de ratas consiste en tomar al animal con la mano hábil por el tórax, de forma envolvente, tal como se toma para el traslado de jaula, procurando ahora el entrecruzamiento de los miembros anteriores (**Figura 9**). Las ratas de hasta 150 g de peso pueden sujetarse con una sola mano, pero para las ratas más grandes se precisará utilizar ambas manos. En este último caso, con la mano libre se debe dar apoyo a los cuartos traseros del animal al mismo tiempo que se sostienen las patas traseras y la cola, impidiendo sus movimientos.



Figura 9. Método de entrecruzamiento de miembros anteriores. Fuente: Bioterio-UNSL, 2021.

Otra técnica para inmovilizar la mandíbula y lograr una buena sujeción para procedimientos menores consiste en pasar el dedo índice a un lado de la cabeza y el dedo medio al otro lado, y el pulgar y el anular por debajo de las patas delanteras (**Figura 10**). A esta maniobra se la suele llamar “agarre de *T. rex*”. Otra forma de inmovilizar una rata adulta es cruzando una pata delantera por debajo de la mandíbula, con ayuda del dedo pulgar (**Figura 11**).



*Figura 10. Maniobra “agarre de *T. rex*” para la inmovilización de una rata adulta. Fuente: Bioterio-UNSL, 2021.*



Figura 11. Maniobra alternativa para la inmovilización de una rata adulta. Fuente: Bioterio-UNSL, 2021.

Si se requiere mayor restricción de movimiento, se puede emplear la técnica de pinzamiento. Primero, se debe pinzar la piel del cuello del animal, el cual deberá estar sujeto con sus patas delanteras a una superficie rugosa. Luego, sin soltar el pinzamiento, se debe flexionar hacia atrás la piel del cuello y, al mismo tiempo, tomar la piel del dorso con los otros dedos y la palma de la mano. Si el animal queda bien sujeto, no moverá su cabeza y se podrá levantar sin dificultad. Aquí no es necesario sujetar la cola, pero es importante darle soporte a los cuartos traseros del animal con la otra mano (**Figura 12**).



Figura 12. Técnica de inmovilización por pinzamiento en rata. Fuente: Bioterio-UNSL, 2021.

RATONES:

Para inmovilizar un ratón, primero hay que sacarlo de la jaula sujetándolo por la cola con la mano no diestra y apoyándolo (sin soltarlo) sobre una superficie rugosa o rejilla contra la que pueda ejercer resistencia. Luego, sosteniendo la base de la cola, se debe aplicar una suave tracción hacia atrás para que el cuerpo del animal se estire. Finalmente, se debe tomar la piel del dorso del animal con los dedos índice y pulgar, comenzando a la altura de las orejas del mismo. Al levantarlo, debe permanecer en posición vertical formando una línea y la cola debe situarse entre los dedos meñique y anular del operador (**Figura 13**). No ejerza demasiada presión sobre el cuello. Supervise constantemente la coloración de la piel, mucosa y lengua durante la sujeción, evitando que el animal tome un tono azulado (cianosis).



Figura 13. Inmovilización de ratón adulto. Fuente: *Bioterio-UNSL, 2021.*

✓ *Restricción de movimiento con uso de cepo*

Existen en el mercado cepos de acrílico donde el animal se introduce quedando sujeto, permitiendo al operador administrar sustancias o tomar muestras a través de orificios en el dispositivo. Para ratas, también se pueden conseguir cepos descartables de polipropileno (**Figura 14**).

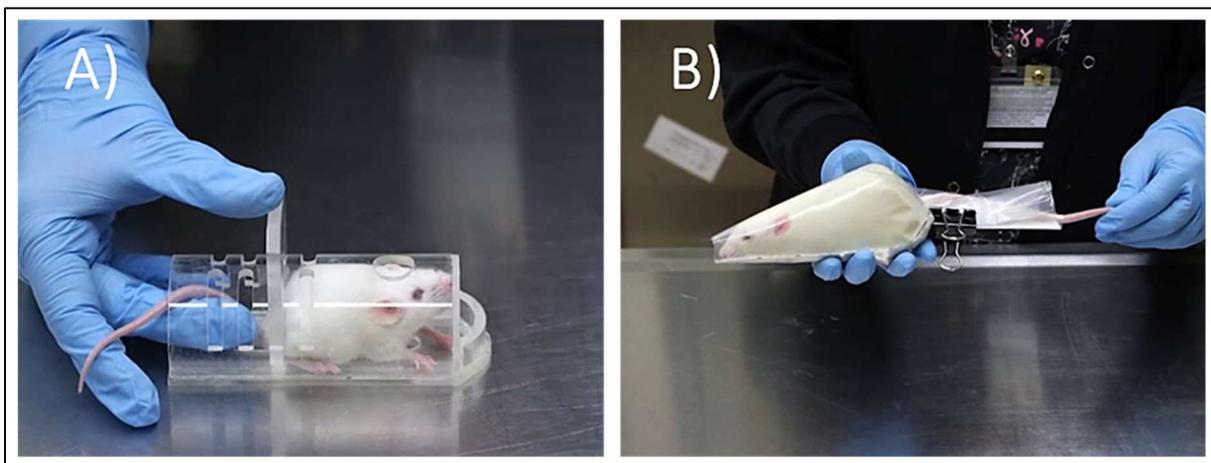


Figura 14. Cepo de acrílico (A) y de polipropileno (B). Fuente: *JoVE Science Education Database, 2021.*

MÉTODOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ROEDORES DE LABORATORIO

Los responsables de cada protocolo de investigación deben seleccionar el método de identificación que: cause el menor malestar o daño posible a los animales; sea en la medida de lo posible indoloro, tanto en la aplicación como durante el experimento; no interfiera con la investigación; el personal puede realizar con destreza; sea el más adecuado según la edad de los animales; permanezca durante el experimento; sea el más adecuado según el número de animales a utilizar, etc.

Métodos no permanentes

- **Corte de pelo**, según un código numérico.
- **Identificación con colorantes o tintes no tóxicos**. Puede realizarse sobre el pelo o en la cola, utilizando marcadores indelebles (**Figura 15**). En los animales de pelaje oscuro, las marcas en la cola son la mejor opción. El marcado puede durar de 10-20 días, por lo que se recomienda para experimentos de corta duración y en los que se usan pocos animales. En el caso de recién nacidos, el tinte puede durar 24 horas como máximo ya que la madre se encargará de limpiar a sus crías.

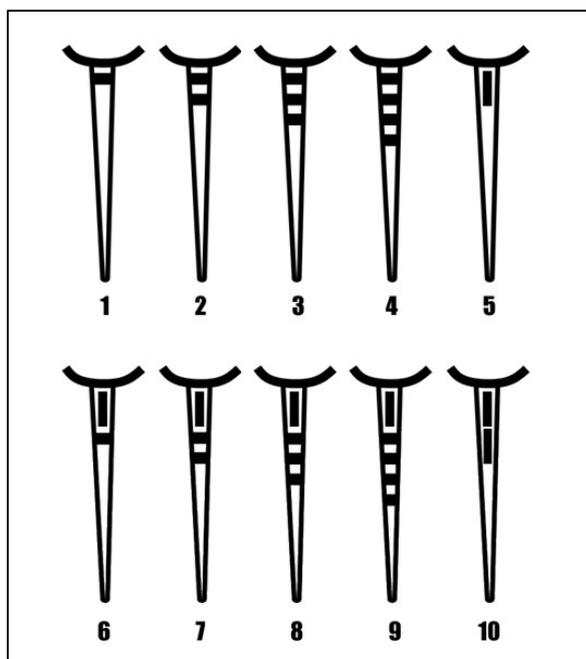


Figura 15. Demostración ilustrada de identificación de roedores con marcador indeleble. Fuente: Flecknell and Waynforth, 1995 (modificado).

Métodos permanentes

- **Perforaciones y/o muescas:** se realizan en las orejas con ayuda de un sacabocado o una tijera para cirugía, de acuerdo a un código preestablecido (**Figura 16**). Es fácil y causa poco trauma. Cada grupo requiere su propio equipo de perforación. Es posible que las perforaciones cierren después de algunos meses.

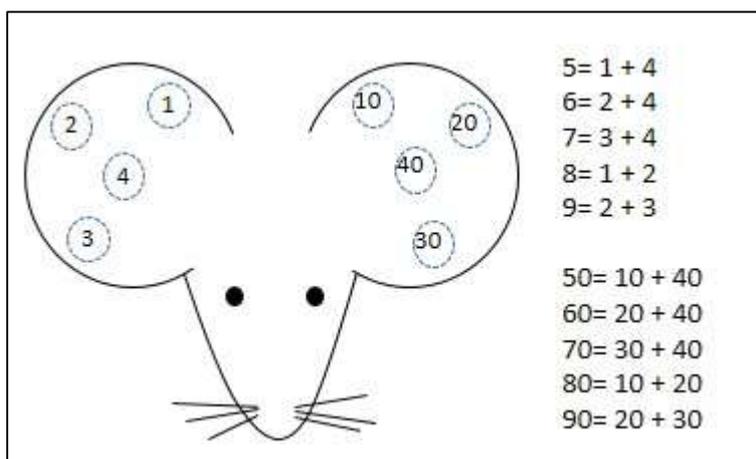


Figura 16. Perforaciones en orejas de roedor como método de marcación permanente. Fuente: <https://www.researchgate.net/publication/283056744> (modificado)

- **Grampas enumeradas:** están hechas de acero inoxidable y se fijan a la oreja con unas pinzas especiales. En el caso de los ratones, no es un método recomendado ya que suelen lastimarse la oreja al intentar sacarla. Además, se la pueden arrancar durante una pelea.
- **Tatuajes:** solo deben ser realizados por personal capacitado, que primero inmoviliza al animal y luego introduce la tinta en las capas intradérmicas de la cola. Se pueden marcar hasta 50 ratones con la misma aguja, pero se debe desinfectar entre ratón y ratón. También existe el sistema de Somark *Labstamp*[™] que agrega automáticamente un tatuaje a la cola del ratón en unos segundos.
- **Microchips:** se insertan subcutáneamente en el cuello o espalda. Son permanentes y no provocan reacciones de rechazo, pero son costosos.

SEXADO DE RATAS Y RATONES

La determinación del sexo de los animales (sexado) se realiza por simple observación de la zona perianal. Para dicho propósito, se evalúa la distancia entre la papila genital y la apertura anal, siendo casi el doble en los machos. El tamaño de la papila genital también es ligeramente mayor en los machos. Además es posible observar una pequeña mancha negra en el escroto desde el primer día de vida. En las hembras, principalmente entre los días 9 y 15 de vida, o durante la preñez y la lactancia, se puede distinguir la falta de pelo alrededor de las mamas (**Figura 17**).

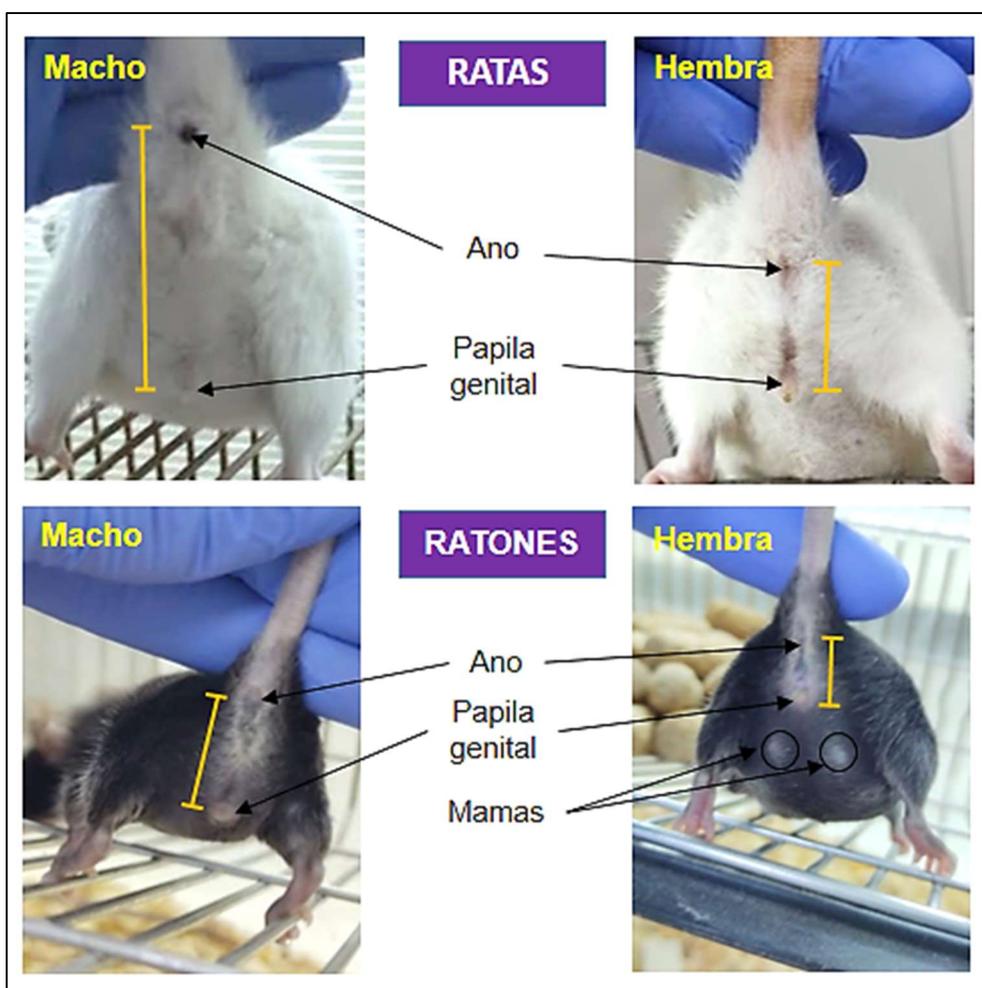


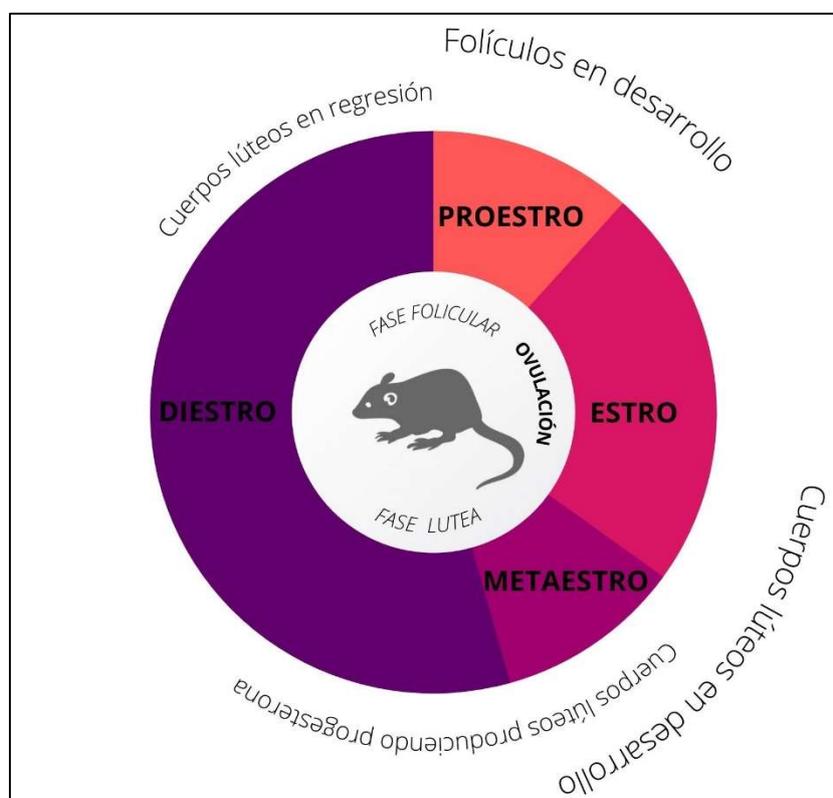
Figura 17. Sexado de ratas y ratones. Como puede observarse, en ambas especies la distancia ano-genital es aproximadamente el doble en los machos que en las hembras. Además, la papila genital es más prominente en los machos. En el panel inferior (ratones), se distinguen las mamas en la hembra. Fuente: elaboración propia.

CICLO ESTRAL Y CITOLOGÍA VAGINAL

El ciclo reproductivo de ratas y ratones hembra se denomina ciclo estral y comprende las siguientes etapas: proestro, estro, metaestro (o diestro I) y diestro (o diestro II) (**Figura 18**).

En ratones, la apertura del orificio vaginal se produce alrededor del día 24 postnatal, mientras que en las ratas suele ocurrir entre los días 32-36 postnatales. Tras este evento, en ambas especies se pueden observar algunos ciclos irregulares antes de establecerse un patrón recurrente de ciclos estrales con una duración de 4 o 5 días. Cabe destacar que los ciclos pueden ser influenciados por las condiciones ambientales.

La progresión a través del ciclo estral implica cambios periódicos en la morfología de las células epiteliales vaginales. El aspecto de estas células normalmente se correlaciona con el estado de la mucosa vaginal, útero, y ovarios y está vinculado a variaciones en las concentraciones de esteroides sexuales y gonadotropinas circulantes. Por consiguiente, la evaluación de la citología vaginal ha sido empleada como un método no invasivo para analizar los ciclos reproductivos en roedores y obtener información sobre el estado funcional del eje hipotálamo-hipófisis-ovario.



*Figura 18. Representación esquemática del ciclo estral en ratas y ratones.
Fuente: elaboración propia.*

- **PROESTRO:** dura un promedio de 14 horas en ratas y menos de 24 horas en ratones. La vulva está ligeramente inflamada y la vagina seca, con un progresivo engrosamiento epitelial. En útero aumenta el flujo de sangre, hallándose distendido por la acumulación de fluidos. En el frotis se presentan escasos leucocitos (- 10%), abundantes células epiteliales ovaladas de bordes lisos, núcleo redondeado y voluminoso y citoplasma basófilo (+ 60%), y algunas células cornificadas de los estratos superiores (- 30%). Esta etapa se caracteriza por el crecimiento folicular y un aumento de la secreción de estradiol que actúa a nivel hipotalámico provocando una descarga de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). En la hipófisis, la GnRH promueve la liberación de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH), dando lugar a una serie de eventos que culminan con la ovulación.
- **ESTRO:** su duración varía entre 24 y 48 horas en ratas y entre 12 y 48 horas en ratones. Aquí tienen lugar el celo y la ovulación. La estimulación digital de la región pélvica produce una lordosis refleja (test de Blandau o de respuesta copulatoria). La vulva está inflamada y las paredes de la vagina presentan un aspecto blanquecino y lustroso. La citología vaginal se caracteriza por presentar escasos leucocitos (- 10%), muy pocas células epiteliales (- 25%) y un gran aumento de células epiteliales anucleadas queratinizadas (conocidas también como células escamosas o cornificadas). En esta etapa pueden observarse imágenes en forma de hoja de helecho, típicas de la cristalización del moco vaginal.
- **METAESTRO (DIESTRO I):** dura aproximadamente 6-8 horas en ratas y hasta 24 horas en ratones. En esta etapa inicia la regresión del epitelio vaginal, coincidiendo con la presencia de cuerpos lúteos que secretan progesterona. La citología vaginal se caracteriza por la presencia de células cornificadas y leucocitos. Paulatinamente, las células cornificadas van desapareciendo y los leucocitos van aumentando. Los tejidos reproductivos se preparan para la recepción del óvulo fertilizado luego del apareamiento en el estro. Hacia el final de esta etapa, la vulva retorna a la normalidad.
- **DIESTRO (DIESTRO II):** es la etapa más larga del ciclo estral con una duración promedio de 48 a 72 horas tanto en ratas como en ratones. La citología vaginal se caracteriza por el predominio de leucocitos y muy escasas células epiteliales de la capa basal. Si la fertilización no tuvo lugar, ocurre la regresión de los cuerpos lúteos y los niveles de progesterona disminuyen. Entonces, la presencia de pequeños

grupos de células epiteliales nucleadas anuncia el proestro al día siguiente. Algunas ratas con un ciclo regular de 5 días, pueden presentar 3 días consecutivos de diestro.

Procedimiento de ciclado

Para obtener el exudado vaginal, se recomienda utilizar un gotero con cabeza de goma y punta de polipropileno que contenga 50-100 μ L solución salina normal (NaCl al 0,9% en agua) estéril y a temperatura ambiente. Primero, el animal debe colocarse sobre una superficie rugosa, sujetándolo por la base de la cola para exponer la zona genital. Luego, la punta del gotero debe insertarse unos 5 mm en la abertura vaginal y la solución salina normal debe descargarse lentamente. Es importante tener en cuenta que la punta del gotero no debe insertarse demasiado profundo ya que podría causar una estimulación excesiva del cuello uterino e inducir un diestro persistente (característico de una pseudopreñez). Finalmente, la muestra, recolectada con el mismo gotero, debe colocarse sobre un portaobjetos para su posterior observación al microscopio óptico a 100x y 400x (**Figura 19**). Las células obtenidas se pueden evaluar inmediatamente en fresco, o se pueden teñir con una solución de cristal violeta (0,1%) después de dejar secar la muestra a temperatura ambiente. Si es necesario ciclar más de un animal, se debe cambiar la punta o se debe enjuagar minuciosamente el gotero para eliminar las células residuales.



Figura 19. El ciclado en roedores. Primero, se observa el procedimiento para la toma de muestra, luego la visualización de la misma al microscopio óptico y una ilustración de la citología vaginal característica de cada etapa del ciclo estral. Fuente: elaboración propia.

BIBLIOGRAFÍA

- Ayala, M. A. (2021). Protocolo de Trabajo Área de Producción de Animales Frente al COVID 19. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de la Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Canadian Council on Animal Care (2003). Guidelines on: laboratory animal facilities — characteristics, design and development. 108 p. Revision date: May 2020. ISBN: 0–919087–41–8
- Cora, M. C., Kooistra, L., & Travlos, G. (2015). Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicologic Pathology*, 43(6), 776-793.
- del Río-Carbajo, L., & Vidal-Cortés, P. (2019). Tipos de antisépticos, presentaciones y normas de uso. *Medicina Intensiva*, 43, 7-12.
- Díaz, G., & Brito, L. (2006). Principios éticos para la utilización de animales de experimentación. *Biomédicas*. Disponible en: <https://www.biomedicas.unam.mx/wp-content/gacetitas/2006/diciembre.pdf?x21431> (último acceso: diciembre 2021).
- DISPOSICIÓN A.N.M.A.T. N° 6344/96 Laboratorio – Bioterio – Requisitos.
- Flecknell, P. A., & Waynforth, H. B. (1995). Experimental and surgical technique in the rat. *Psicothema*, 7(2), 452-453.
- Freeman, M. E. (2006). Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En: *Knobil and Neill's Physiology of reproduction*, 3a ed. Cap. 43. Ed By Jimmy D. Neill Elsevier, 2327-330.
- Fuentes, F. M., Mendoza, R. A., Rosales, A. L., & Cisneros, R. A. (2008). Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón. Lima, Perú. Instituto Nacional de Salud.
- Galassi-Gerez, P. F., & Gullace, F. A. (2004). Reproducción en animales de laboratorio. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Guía para cuidado y uso de animales de experimentación [en línea]. Disponible en: https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-gua_cuidado_y_uso_de_animales.pdf (último acceso: septiembre 2021).
- JoVE Science Education Database. (2021). Lab Animal Research. Rodent Handling and Restraint Techniques. JoVE, Cambridge, MA.

- McLean, A. C., Valenzuela, N., Fai, S., & Bennett, S. A. L. (2012). Performing Vaginal Lavage, Crystal Violet Staining, and Vaginal Cytological Evaluation for Mouse Estrous Cycle Staging Identification. *J. Vis. Exp.* (67), e4389.
- Montenegro, S., Gayol, M. C., & Tarrés, M. C. (2011). Aspectos éticos de la investigación con animales. *Revista Médica Rosario*, 77, 69-74.
- Mourelle, A. C., Herrero, E., & Ricca, M. (2013). Recomendaciones para manipulación y sujeción de ratas y ratones de laboratorio. *Spei Domus*, 9(19), 39-47.
- National Research Council (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition*. Washington, DC: The National Academies Press.