

Compromiso institucional

Normas básicas del cuidado y bienestar animal

ANIMALARIO DEL CTB-UPM

El uso de animales para fines científicos y educacionales es un privilegio que conlleva responsabilidades y obligaciones morales para asegurar el bienestar de los animales

El Centro de Tecnología Biomédica de la Universidad Politécnica de Madrid (CTB-UPM) está éticamente comprometido con el cuidado y el uso humanitario de los animales utilizados en investigación científica

En el CTB-UPM, los animales son tratados con respeto y dignidad. Nuestra Universidad reconoce que la ciencia de alta calidad y el cuidado animal humanitario son inseparables



Una sólida cultura del cuidado, que apoye el bienestar general de todos los animales y personas involucradas en el descubrimiento biomédico, puede impulsar aún más la productividad, reforzando nuestra investigación hacia una ciencia de mayor calidad

Nuestra institución está comprometida con la aplicación de los principios de las 3R en investigación animal. Por ello, el Comité de Ética de nuestra institución vela por garantizar que los distintos estudios y procedimientos con animales desarrollados en nuestro centro, se realicen utilizando el menor número posible de animales para llegar a conclusiones biológicamente relevantes, refinando y optimizando los procedimientos para asegurar el máximo bienestar en los animales, y asimismo, siempre que sea posible, reemplazando los estudios con animales por otras alternativas científicas y educativas (cultivos celulares, modelos "in silico")

Nuestra institución promociona la formación continua del personal involucrado en el cuidado y manejo de los animales, para lograr que los animales de laboratorio sean tratados de acuerdo a los más altos estándares éticos y científicos, y garantizar con ello su bienestar en la mayor medida posible, única forma de lograr el éxito científico y educacional

Por ello, en las páginas que siguen, se exponen una serie de pautas y directrices para el personal investigador principal y en formación, para un mejor manejo y bienestar de la especie *Mus Musculus* (ratón común), que constituye la especie mayoritaria alojada en las instalaciones del animalario del CTB-UPM

GUÍA DE MANEJO Y CUIDADO DE ANIMALES DE LABORATORIO: RATÓN

- 1) El ratón: características y cuidados. Normas de seguridad**
- 2) Manejo e inmovilización de ratones**
- 3) Administración intraperitoneal de sustancias**
- 4) Métodos de eutanasia**
- 5) Puntos finales humanitarios**

1) RATÓN: CARACTERÍSTICAS Y CUIDADOS

El animal de laboratorio tiene que ser respetado como ser vivo, entender que padece necesidades y sufre dolor, por responsabilidad moral y por normativa legal, es obligación del personal que lo cuida, mantiene y utiliza (investigador), asegurar su bienestar y confort mientras viva

El uso de animales de laboratorio en estudios de investigación biomédica y aspectos educacionales, requiere que éstos sean los apropiados para que proporcionen la seguridad en los resultados esperados, para ello, es necesario contar con bioterios que brinden animales de calidad microbiológica y genéticamente definidos mantenidos bajo condiciones estandarizadas y de acuerdo con normas internacionales establecidas

El bioterio de producción debe contar con una estructura física y organizacional especialmente diseñada para la cría y mantenimiento de animales de laboratorio. Tiene que ser de ubicación exclusiva, fuera del alcance de peligros sanitarios

Un objetivo principal de tener un bioterio es asegurar la procedencia de animales sanos para que no interfieran en los trabajos científicos de las diferentes áreas de investigación. Los determinantes de un bioterio para un buen desempeño son:

Aspecto de infraestructura

Animales definidos

Personal capacitado



El personal que trabaja en un bioterio de producción o de experimentación debe estar lo suficientemente capacitado, de acuerdo con las características de las instalaciones, número de animales mantenidos y la naturaleza de la investigación que se va a realizar. Es responsable de la atención y mantenimiento correcto de los animales asignados

El personal investigador principal o en formación además de estar capacitado para manejar y realizar procedimientos con animales, tiene que conocer las características de la especie animal con la que habitualmente trabaja y como asegurar su bienestar, única forma de alcanzar los objetivos científicos



El ratón doméstico es una especie cosmopolita, se adapta a una gran variedad de condiciones ambientales, desde zonas muy frías hasta regiones tropicales. En general, las especies prefieren ambientes más secos que húmedos

El ratón es un mamífero de sangre caliente, de hábitos nocturnos y su comportamiento esta 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 (por ejemplo música estruendosa) ya que el ruido intenso puede producir alteraciones en los sistemas gastrointestinal, nervioso y cardiovascular, hormonal, cambios metabólicos, problemas de sueño y alteraciones del comportamiento. Su sentido del olfato está muy desarrollado, no sólo para detectar comida y depredadores, sino también para percibir un orden social

Algunas condiciones ambientales y procedimientos rutinarios en el alojamiento del animal pueden producir respuestas de estrés, y cuando el animal no es capaz de mantener su homeostasis en presencia de un determinado factor estresante, su bienestar se ve seriamente amenazado

Por su pequeño tamaño son muy susceptibles a cambios ambientales, puesto que una variación de la temperatura entre 2 a 3°C, puede afectar a 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 ganan rápidamente peso durante la lactancia. Tienen una vida útil de 10 a 12 meses y se suelen obtener de ocho a diez crías por camada

En los procedimientos de cría y manejo de los ratones deberían siempre tenerse en cuenta y aplicarse el concepto de las cinco libertades (1) libres de sed hambre o malnutrición, (2) libres de incomodidad, (3) libres de dolor, daño y enfermedad, (4) libres para expresar comportamientos y exploración normales y (5) libres de miedo y angustia

Como investigadores, siempre tendremos que velar para que estas cinco libertades se cumplan, comunicando a los investigadores principales, veterinarios asignados así como al personal cuidador cualquier tipo de incidencia que suponga una violación de estos principios

1.1) 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 debe seguir los procedimientos e instrucciones habituales normalizados relacionados con el manejo de animales:

- Buena higiene de personal**
- Uso de la vestimenta completa (bata, calzas y guantes)**
- Procedimiento de registro (al entrar en el animalario es necesario apuntar el nombre y hora de entrada/salida en el libro de registro del personal)**
- Seguir los procedimientos de limpieza y desinfección de materiales**
- Seguir los procedimientos de eliminación de desechos**

1.1) Normas de seguridad y protección del personal

Otras normas de higiene y de seguridad incluyen:

El uso de una vestimenta completa de uso exclusivo en el bioterio

Todo animal encontrado en la sala, libre, debe ser eliminado y no devuelto a la colonia

Se debe trabajar con el menor ruido posible para reducir el estrés ocasionado a los animales

Uso de gafas de seguridad cuando el procedimiento de investigación lo requiera

1.1) Normas de seguridad y protección del personal

Otras normas de higiene y de seguridad incluyen:

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

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

Mantener el área limpia

Uso de equipos en buenas condiciones

1.1) Normas de seguridad y protección del personal

Otras normas de higiene y de seguridad incluyen:

Eliminación de desechos en la forma correcta. Uso de contenedores amarillos para material biológico contaminado y bolsas de color negro para material sucio o desechos no contaminados

Rotular correctamente las jaulas, con número de PROEX y nombre del investigador responsable

Restringir el acceso a personal extraño, permitir sólo el acceso a personas autorizadas

No comer, beber, fumar o aplicarse cosméticos en las salas de animales

Informar inmediatamente al jefe o coordinador de cualquier incidente o si tiene problemas respiratorios (asma), neurológicos o alergias



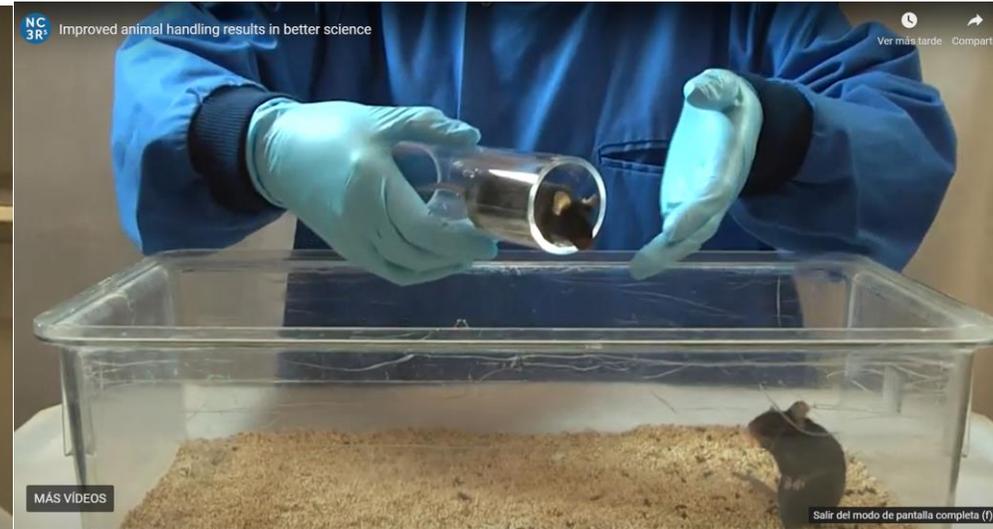
2) MANEJO E INMOVILIZACION DEL RATÓN

Para comenzar con la técnica de manipulación se debe realizar un acercamiento suave a los animales

La forma más utilizada para manipulación de ratones adultos y crías a partir del destete es levantar al animal tomándolo desde la base de la cola, lo más distalmente posible del punto medio con los dedos pulgar e índice, sin ejercer demasiada presión; hay que colocarlo de inmediato en la superficie deseada, o bien darle apoyo en la palma de nuestra mano hasta trasladarlo al lugar definitivo

En el caso de las crías, si son recién nacidas se deben tomar en grupo en la palma de la mano ; es conveniente incluir un poco del material del nido. Para crías desde los siete días, se recomienda tomarlas ya individualmente, ya que se mueven con mayor facilidad

Siempre que sea posible, si el procedimiento lo permite, se cogerá el ratón con ambas manos o con un tubo cilíndrico. Agarrar la cola es un procedimiento establecido que sin embargo no está exento de estrés y ansiedad para el animal, pudiendo comprometer los resultados de diferentes estudios, especialmente en tests de comportamiento



<https://nc3rs.org.uk/>

Es muy importante saber cómo realizar una inmovilización adecuada como paso previo por ejemplo a la inyección de una sustancia

Para llevar a cabo la inmovilización, se toma al ratón por la cola y se los deposita sobre una superficie no lisa, como una rejilla (resulta práctico emplear la propia cubierta de la jaula). El objetivo de esto es hacerles sentir un ligero desequilibrio para ganar unos segundos, en los cuales procederemos a tomarlos, con un pellizco, de la piel de la nuca con los dedos de la mano izquierda (si la persona es diestra), sujetando la cola con otro dedo de la misma mano



El método óptimo, una vez llegados a este punto, será el de colocar al animal con el vientre hacia arriba, reposando sobre la palma de la mano del operario, y con la cabeza apuntando ligeramente hacia abajo (hacia el suelo). De esta manera, en caso de una inyección intraperitoneal, el paquete visceral se desplazará por gravedad hacia la parte dorso-craneal, haciendo que sea más difícil pinchar algún órgano por accidente

Se debe tener cuidado a la hora de la colocación de los dedos, pues son animales activos y con mucha facilidad de movimiento que en muchos casos tratarán de morder. Debemos también tener cuidado, una vez el animal esté sujeto, de no hacerlo con mucha fuerza pues dada su fragilidad en relación a nuestro tamaño, una presión muy fuerte puede provocar una oclusión de los vasos sanguíneos de retorno al tórax, así como de la respiración. Para los neonatos lo haremos de manera parecida, sólo que en general los podremos coger directamente del pliegue dorsal de la piel, extremando las precauciones por su gran fragilidad

3) ADMINISTRACION DE SUSTANCIAS

La administración de sustancias se puede realizar por diferentes vías que se clasifican en enterales, parenterales, vía tópica e inhalatoria

La vía parenteral implica la ruptura de las barreras del organismo, la piel y las mucosas, depositando las sustancias en los tejidos o en cavidades internas del organismo. Respecto a las inyecciones intravenosa (IV) o intramuscular (IM), un método muy común de inyección de sustancias en roedores es la vía intraperitoneal (IP). Esta también es la vía de administración de anestésicos de media duración como la ketamina

En el ratón, el punto de inyección se localiza en el cuadrante inferior derecho, lateral a la línea media

Procedimiento de administración de sustancias por vía intraperitoneal (IP):

Con la cola en una mano y el pescuezo en la otra, es necesario introducir la base de la cola entre la palma y los dedos meñique o anular de la mano que sostiene la nuca

La aguja debe de inclinarse para penetrar el peritoneo pero sólo debe introducirse una pequeña fracción de la aguja, a fin de evitar un posible daño a los órganos abdominales

La inyección tiene que ser gradual, en un intervalo recomendado de aproximadamente cinco segundos



Otras consideraciones durante la administración IP:

Durante la inmovilización del ratón, la colocación de la cabeza en un plano inferior al resto del cuerpo reduce los riesgos de inyección dentro de un órgano abdominal

La longitud de la aguja de inyección no debe ser excesivamente larga ya que el grosor de la pared abdominal del ratón es de pocos mm

Agujas superiores a 1 cm de longitud e insertadas en su totalidad aumentan considerablemente las posibilidades de depositar la sustancia en un lugar inapropiado o lesionar estructuras circundantes

4) EUTANASIA

La eutanasia es un método humanitario de sacrificio de animales, el cual debe producir un sufrimiento mínimo (dolor, angustia y miedo). Tal y como lo define el Real Decreto 1201/2005, la eutanasia es el sacrificio de un animal con el menor sufrimiento físico y mental posible, de acuerdo con su especie y estado

¿En que condiciones se aplica la eutanasia? (I) :

Cuando finaliza un experimento y es necesario obtener muestras de diversos tejidos del animal que permitan estudiar aspectos adicionales de esa investigación

Cuando los animales ya no sean aptos para la producción o cría (renovación)

Cuando los animales de reserva excedan las necesidades o no resulten idóneos para la realización de estudios científicos

¿En que condiciones se aplica la eutanasia? (II) :

SIEMPRE se debe practicar eutanasia cuando el animal tenga un elevado grado de sufrimiento, superior a lo previsto, y este sufrimiento no pueda ser rápidamente revertido con otras medidas de punto final humanitario

SIEMPRE se debe practicar eutanasia cuando no se pueda cumplir con el objetivo de mantener la salud y bienestar

Los signos típicos de dolor y angustia en la mayoría de las especies animales, incluyendo los ratones, son entre otros: conducta de huida, inmovilización, defensa o agresividad, vocalizaciones de angustia (no siempre audibles por el hombre), taquicardia, jadeo, micción, defecación, aumento de la salivación y sudoración, contracciones reflejas de la musculatura esquelética y dilatación pupilar

El objeto de este procedimiento normalizado de trabajo es definir los métodos de sacrificio humanitarios y no dolorosos, seguros para el personal, de acción rápida, apropiados para la edad, especies y nº de individuos, irreversibles, y que no produzcan cambios en los órganos o tejidos que interfieran con los estudios. La correcta realización de los mismos garantizará el mínimo sufrimiento y estrés de los animales durante su sacrificio

Todas las eutanasias se realizarán de acuerdo con las directrices establecidas en el Anexo III del Real Decreto 53/2013

EUTANASIA: sólo realizable por personal capacitado y entrenado en el manejo del animal

El procedimiento de eutanasia sólo puede ser realizado por personal cualificado y con capacitación para la función b (Eutanasia de los animales) según la orden Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo

Está totalmente prohibido el sacrificio de un animal en presencia de otros animales, ya que les induce miedo y angustia. Por tanto, la eutanasia debe ser llevada a cabo en salas donde no haya animales estabulados y en un lugar alejado del resto de animales experimentales

Para roedores adultos de pequeño tamaño (rata y ratón) en el animalario del CTB-UPM se recomiendan los siguientes métodos:

Dislocación cervical

Sobredosis anestésica

4.1) Dislocación cervical

Se emplea en ratón y en roedores jóvenes. La aplicación correcta del método debe producir una lesión irreversible del tallo cerebral e inconsciencia inmediata

Dado que es un método desagradable para el operador o incluso puede afectar al bienestar del animal si el procedimiento no es realizado con suficiente rapidez y habilidad, se recomienda previamente la administración previa de un sedante o anestésico

4.1) Dislocación cervical

Colocar el animal en posición decúbito prono sobre una superficie rugosa para evitar que resbale

Sujetar el animal colocando el dedo índice o una pinza en la región cervical ejerciendo presión y con la otra mano tirar de la cola o extremidades posteriores bruscamente para provocar la separación de las vértebras cervicales con el cráneo

Confirmar la separación de la vértebra cervical con el cráneo por palpación

Introducir los animales en el contenedor habilitado para recogida de cadáveres

4.2) Sobredosis de anestesia

La mayoría de los métodos farmacológicos empleados se basan en la administración de agentes anestésicos que producen inconciencia, fallo cardiovascular, fallo respiratorio y muerte

Dado que existe la posibilidad de error en la dosificación o administración y el animal pudiera recuperarse, siempre debe asegurarse la muerte con otros métodos, por ejemplo dislocación cervical

4.2) Sobredosis de anestesia

Los agentes inhalatorios se emplean preferentemente en animales de pequeño tamaño como los ratones

Entre ellos el más utilizado es el Dióxido de Carbono o CO_2 (no debe usarse en neonatos, ya que son insensibles a los efectos del CO_2 debido a su mayor su tolerancia a la hipoxia). Este método solo debe usarse en ratones mayores de 7 días

Los animales son colocados en una cámara y expuestos a una concentración creciente de CO_2

El CO_2 produce acidosis en los tejidos y pérdida de consciencia seguido de muerte por fallo respiratorio y cardiaco

4.2) Sobredosis de anestesia

Concentraciones de CO₂ superiores al 40 % producen ardor y dolor en las personas. Dado que la mucosa de los ratones es igualmente sensible, este procedimiento se debe realizar utilizando concentraciones crecientes de CO₂ (flujo de 20-25 % por minuto), hasta que el animal pierda la consciencia antes de haber alcanzado una concentración del 40 %. Una vez alcanzada la inconsciencia, el flujo puede ser incrementado para producir la muerte del animal

Una aproximación alternativa es usar un agente anestésico como isoflurano para inducir la pérdida de consciencia en el animal y seguidamente someterlo a una concentración elevada de CO₂

Al igual que otros métodos de eutanasia, la muerte debe siempre confirmarse después de haber llevado a cabo el procedimiento

Tras la eutanasia, un aspecto de gran importancia para el bienestar de los animales es la confirmación de muerte de los mismos. Los signos indicativos son varios:

Ausencia de movimiento respiratorio (ventilación pulmonar) y latido cardiaco

Ausencia de reflejos

Dilatación pupilar

Cianosis de las mucosas por falta de oxigenación

Debe tenerse en cuenta que es posible la aparición de algunos de estos signos aislados durante el curso de la anestesia y no implican necesariamente la muerte del animal

5) PUNTOS FINALES HUMANITARIOS

Los puntos finales humanitarios definen los criterios que son utilizados para determinar, basado en razones humanitarias, cuando finalizar el estudio de un animal individual (o una cohorte de animales) ANTES de que haya finalizado el experimento que se planteó realizar

Un punto final humanitario por tanto, se puede definir también como "el indicador más temprano de (posible) dolor y/o sufrimiento en un experimento animal que, dentro de un contexto de justificación moral y puntos finales científicos a alcanzar, se pueda utilizar para evitar o limitar el dolor y/o sufrimiento actuando con medidas tales como el sacrificio humanitario o el alivio de dolor y sufrimiento" (Hendriksen y Morton, 1999)

Los puntos finales humanitarios no siempre tienen que finalizar con la eutanasia del animal, dado que pueden estar basados en la finalización de un procedimiento doloroso

También puede implicar la administración de tratamientos para aliviar el dolor y la angustia

Los criterios de punto final humanitario (eutanasia, tratamiento, cambio de condiciones de estabulación, etc..) para un determinado animal se establecen en virtud de un protocolo de actuación basado en la evaluación, típicamente, de signos morfológicos (aspecto físico) y de conducta del animal

Este protocolo debe estar documentado en la memoria del proyecto a realizar y con acceso a todo el personal involucrado en el cuidado y manejo de los animales

Los criterios de evaluación de puntos finales humanitarios en animales como el ratón pueden ser lo siguientes:

Pérdida de peso de un 5 a un 25%

Incapacidad para deambular (inmovilidad) se quedan quietos en una esquina de la jaula

Respiración dificultosa (bocanadas de aire)

Deshidratación

Postura encorvada

Piloerección (pelos de punta)

Heridas o pérdida de pelo

Agresividad

Secreción ocular o respiratoria

Incapacidad para acceder a comida o bebida

Falta de aseo (mal aspecto)

Incapacidad para hacer un buen nido

Cambios morfológicos en: ojos, orejas nariz, mejillas, bigotes

La alteración de cualquiera de estos signos será causa suficiente para que el cuidador traslade al animal a la zona de cuarentena y avise al servicio veterinario, que, tras su reconocimiento informará al responsable del proyecto en el que se esté utilizando el animal.

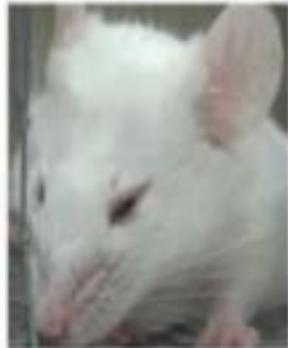
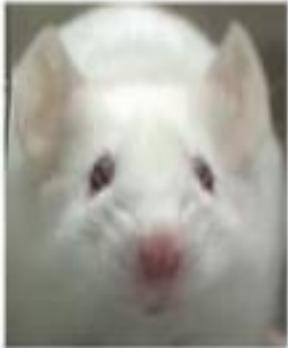
Se someterá a observación diaria por el especialista en bienestar animal y/o veterinario y un responsable del laboratorio, y si reúne las condiciones anteriormente descritas se procederá a su eutanasia, siempre que no sea posible otra medida de punto final humanitario, o será dado de alta y se le devolverá a su sala. Si por alguna causa se decidiera la eutanasia, se informará siempre previamente al investigador

Cambios morfológicos en ojos, nariz, mejillas

Not present
0

Moderate
1

Severe
2

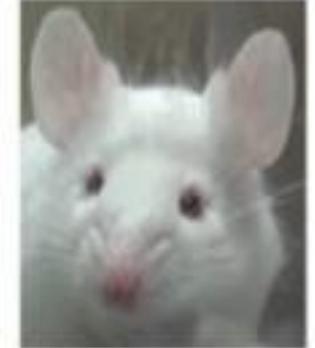


Orbital tightening

Not present
0

Moderate
1

Severe
2

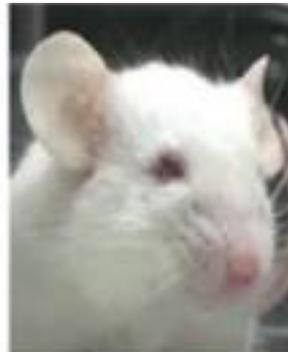
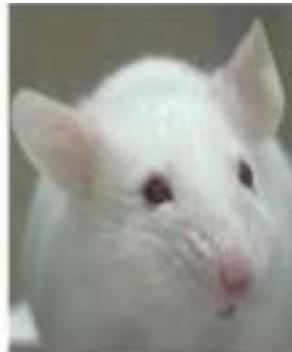


Nose bulge

Not present
0

Moderate
1

Severe
2



Cheek bulge

Cambios morfológicos en orejas y bigotes

Not present
0



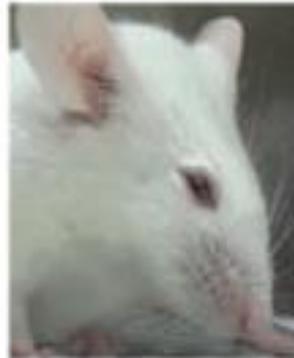
Moderate
1



Severe
2



Ear position



Whisker change