



UNAM

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

MAPEO VASCULAR AURICULAR
EN EL COBAYO (*Cavia porcellus*)

METODO ALTERNATIVO NO INVASIVO PARA IDENTIFICACION Y CONTROL
ANIMAL

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

DAMIÁN ROJAS HERNÁNDEZ

ASESORES DE TESIS:

Dr. JUAN ANTONIO GIMENEZ-SCHERER
M en C. FELIX EDUARDO TENA BETANCOURT



México, D.F.

Septiembre de 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

| TEMA | Página |
|--|---------------|
| Carátula ----- | 1 |
| Índice de Contenidos ----- | 2 |
| Generalidades ----- | 3 |
| Agradecimientos ----- | 4 |
| Resúmenes ----- | 5-6 |
| Introducción ----- | 7-10 |
| Justificación ----- | 10 |
| Hipótesis ----- | 11 |
| Objetivos ----- | 11 |
| Material y Método ----- | 11-12 |
| Método de Retro-Iluminación y Obtención de Imágenes ----- | 12-13 |
| Resultados ----- | 14-17 |
| Cuadro 1- Morfología de Venación Primaria y Secundaria del Cobayo ----- | 15 |
| Cuadro 2- Patrones Complementarios de Venación del Cobayo ----- | 16 |
| Discusión ----- | 18-23 |
| Conclusiones ----- | 23-25 |
| Bibliografía ----- | 26-30 |

Generalidades

El presente trabajo se llevó a cabo en el Servicio de Cirugía Experimental y Bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI de la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS, sito en Av. Cuauhtémoc #330 México 06720 DF, y en el Departamento de Bioterio del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez (INCICH), sito en Juan Badiano No 1 sección XVI, México 14080 DF, bajo la tutoría del Dr. Juan Antonio Giménez-Scherer, Investigador de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología de la UMAE de Pediatría del CMN Siglo XXI, contando con la supervisión del M en C F. Eduardo Tena Betancourt, Profesor de Asignatura adscrito al Departamento de Etología, Fauna Silvestre y Animales de Laboratorio de la FMVZ de la UNAM.

AGRADECIMIENTOS

A mi hija, por ser el motor de mi vida el ser más hermoso del mundo.

A mi esposa, por su apoyo, amor, cariño y paciencia para dar por terminada esta idea.

A mis mejores amigos y asesores, el M en C. Eduardo Tena Betancourt y a su apreciable esposa Clarissa C. de Tena, al Dr. Antonio Giménez-Sherer por sus palabras y estímulo incesante y en especial por su paciencia para continuar y concretar una noble idea.

A mi familia, padres y hermanos, por su apoyo incondicional.

Al personal del Bioterio del Instituto Nacional de Cardiología, “Ignacio Chávez” y al Jefe del mismo por las facilidades brindadas en uso de animales para la culminación de esta tesis.

A mis amigos.

Resumen

Las tendencias relativas al Refinamiento en la experimentación animal han sido notables, y a pesar de los esfuerzos para mejorar el manejo y control animal la validación de resultados depende de su correcta identificación (ID), mediante la mutilación de orejas y dedos, la aplicación de grapas metálicas en las orejas, tatuaje o implante subcutáneo de microchips, así como el uso de tinciones. En adhesión a la Directiva de Refinamiento, se propuso el desarrollo de un método no invasivo para la identificación y control de cobayos de laboratorio por medio de la caracterización de los patrones venosos de las orejas, una característica genéticamente definida, y estudiada bajo un enfoque análogo a la diferenciación vascular de las alas de insectos, las hojas de las plantas y la huella digital humana, considerados eficaces. Este trabajo empleó cien cobayos albinos de la cepa Dunkin Hartley de 60 días a 2 años de edad de ambos sexos. La diferenciación venosa se llevó a cabo en sujetos dóciles sin anestésico o bien ligeramente sedados (Xilazina HCL 3 mg/kg IM), utilizando fotografía digital con retro iluminación. Para caracterizar las imágenes se empleó un software de imagen libre (ImageJ©) que analizó las ramas venosas de las orejas previamente fotografiadas y esqueletonizadas. Los resultados destacaron un árbol vascular (de base al ápice), formando horquillas primarias simples o dobles en su recorrido y variando en forma y tamaño y derivadas a su vez de una vena central, originando una venación más estrecha con venas secundarias dispuestas en una compleja red caracterizada como secundaria. Los patrones complementarios mostraron ramas venosas distintivas en “*T, Y, V*” y representaciones en forma de “*Delta*” conformando lechos venosos lineares, angulados, sigmoideos, en laguna doble o simple, bifurcadas, en forma de árbol, insulares u ondulantes y diferenciando ramas dobles o aisladas. El análisis morfológico mostró variación específica entre los patrones vasculares encontrados. Los datos primarios registraron 41% de Horquillas Dobles, 1% de Horquillas Dobles-simples y 19% de Horquillas Simples (anteriores/posteriores). Los criterios secundarios mostraron disparidad en la conformación venosa subsecuente siendo caracterizada como 16% de Horquillas en Tridente, 13% de Horquillas Simples centrales y 10% de Horquillas en Tridente incompletas. Este método podría permitir una identificación animal de precisión utilizando criterios estándar con hasta 10,500 combinaciones, que ilustran las diferencias morfológicas distintivas de los patrones vasculares auriculares de los cobayos.

Abstract

Research Refinement has been notorious and despite efforts to improve animal handling the validation of research findings still depending on animal identification (ID), such as rodent's ear mutilation, toe-clipping, ear tags, tattooing or implanted microchip transponders and temporal color dyes. In adherence to the Directive of Refinement, a non-invasive method to ID guinea pigs is proposed by characterizing the venous patterns of their ears, a genetically-determined feature, as a novel approach analogous to the vascular differentiation of plant leaves and human identification using fingerprints, both considered accurate methods for ID. One hundred Dunkin Hartley guinea pigs (30-day to 2-year-old) of both sexes were used for differentiation, and handled as docile or slightly sedated subjects (Xylazine HCl 3 mg/kg IM) using digital retroilluminated photography. The image analysis of the skeletonized ear veins using the ImageJ© software demonstrated vessels running as a vascular tree from the base to the apex, forming thus primary, Single or Double Loops varying in shape and size and arising from a midvein giving origin to narrower, secondary veins arranged in a complex network characterized as Secondary. Complementary paths showed distinctive "T, Y, V" and *Delta-Shaped* patterns conforming linear, angulated, sigmoidal, double-lacunae, bifurcated, tree-shaped, insular or undulating vein patterns, that differentiated double or isolated branches. The morphologic analysis demonstrated specific variation among vascular patterns. The Primary data demonstrated a total of 41% Double Loops, 1% Double Simple-Loops and 19% Single Loops (anterior/posterior). The Secondary criteria reported clear disparities, where branching off was characterized as 16% Trident, 10% Trident Incomplete and 13% Simple Central Loop. This method would enable accurate animal identification using these standard criteria up to 10,500 combinations, illustrating distinct morphologic differences of the auricular vascular patterns of guinea pigs.

INTRODUCCION

A pesar de incontables y sobresalientes beneficios derivados del uso de animales experimentales en la medicina moderna,⁽¹⁻⁶⁾ la investigación biomédica actual continúa dependiendo de su empleo, independientemente de que dicha actividad es regulada por estrictas disposiciones éticas y morales en las instituciones que siguiendo políticas de Reemplazo, Reducción y Refinamiento de las técnicas experimentales se han adherido a su cumplimiento por constituir una directiva internacionalmente aceptada.^(7, 8)

La concientización social y las normas internacionales prevalentes han promovido el desarrollo de nuevos criterios de orden experimental, más seguros y eficientes,⁽⁹⁻¹¹⁾ dado que la mayoría de los métodos usados para identificación animal continúan en uso por los investigadores y analistas que conducen estudios farmacéuticos, para satisfacer aspectos regulatorios oficiales particularmente cuando un bioensayo es crítico para definir su seguridad, o bien en pruebas de aseguramiento de la calidad de medicamentos y productos biológicos.^(6), 12, 13) Dicho criterio de control es necesario y se aplica de manera similar en la práctica de la medicina de animales de laboratorio, cuando la meta es la perpetuación de líneas consanguíneas mantenidas bajo estricto apareamiento hermano-hermana o padre-descendencia, independientemente de que los métodos para identificación y control individual son indispensables para el aislamiento de genotipos definidos en colonias de roedores genéticamente modificados, en donde la identidad exacta es crítica para convalidar hallazgos de investigación.^(7, 14-18) Esto último es un aspecto que da origen al uso de métodos de identificación más seguros y no invasivos para con el reactivo biológico.^(7,18)

Paralelamente, en investigación las prácticas para control e identificación animal empleadas por veterinarios e investigadores utilizan tanto métodos temporales como permanentes, que pueden ser resumidos como invasivos y no invasivos.^(18, 19, 20) La desventaja primaria de los métodos no invasivos es que generalmente son de corta duración como el laborioso recorte de pelo, realizado bajo patrones aplicados en animales de color similar, o bien el uso de tintaciones diluidas en alcohol que tiñen en colores amarillo, rojo intenso, púrpura, verde o azul, que al aplicarse en regiones determinadas por medio de códigos *ad hoc* otorgan cierta seguridad para la identificación de roedores albinos. Empero, dichas marcas tienden a diluirse y desaparecer con el tiempo dado que los animales sanos suelen acicalarse a

diario.^(2,3,18) Cabe destacar que estos químicos han sido reportados con capacidad teratogénica,⁽²²⁾ aspecto que ha dado lugar al desarrollo de estudios alternativos para promover su inocuidad una vez destinados para la identificación temporal de sujetos disponiendo así de tinciones más benignas.⁽²¹⁾

Por otro lado, en el interés de lograr una identificación y control animal eficaz, algunos investigadores han recurrido al empleo de la reseña. Esta se basa en la detección de ciertas manchas corporales distintivas, definidas fenotípicamente en forma natural y caracterizan a algunas cepas de cobayos y roedores.⁽²³⁾ Empero, esta facilidad que podría considerarse útil es impráctica en el caso de animales que no sean notoriamente diferentes; asimismo, este método precisa de cierto grado de experiencia por parte del analista para que sea objetiva y en especial reproducible, dado que la mayoría de los investigadores emplean roedores con un fenotipo específico cuya apariencia es idéntica en la mayoría de los casos.^(1,18,24) No obstante lo anterior, este método tradicional juega un importante papel en medicina equina conjuntamente con el uso del genotipo sanguíneo destinado a definir códigos heredables de color, y con ello lograr su diferenciación genética.^(25, 26) Sin embargo, de llegar a usarse rutinariamente dicho método en roedores constituiría un procedimiento costoso y por demás impráctico.⁽²⁶⁾

En este campo de estudio existen otros métodos invasivos más permanentes como la perforación de orejas que tiene un alto índice de error, dado que las muescas hechas en el delgado cartílago pueden ser afectadas por peleas entre los animales y se tornan difíciles de leer, o bien alterarse los números que originalmente fueron asignados después de ciertas semanas. La mutilación de dedos es otra vía para la identificación y control animal, pero frecuentemente resulta en hematomas o infección de manera similar al tan común empleo de aretes metálicos, que suelen desprenderse resultando en la pérdida de identidad, a pesar de que algunos estudios acreditan su empleo cotidiano.^(14, 27, 28)

Abundando en el tema, el micro-tatuaje mediante la inyección de tinta para marcaje de piel, cola, dedos y otros sitios fácilmente observables constituye otro método muy usado por los investigadores,⁽²⁹⁾ independientemente de la fuerte oposición que existe en contra del uso de prácticas dolorosas en animales.^(30, 31) Dichas técnicas son consideradas como inaceptables desde la percepción del bienestar animal, mientras que otros sistemas incluyen

el uso de costosos microchips implantados subcutáneamente para emitir radio frecuencias que identifican y controlar a cada sujeto.^(32, 33, 34) En este caso, algunos reportes han indicado la existencia de una relación negativa entre su empleo y la presencia de cáncer en ratas, ratones y perros. Dicho hallazgo fue observado desde el año 1990 pero publicado hasta 2010 por la Associated Press, de los EUA, en un reporte concluyendo que esta metodología en apariencia inocua representaba un fuerte riesgo de seguridad para perros y seres humanos.⁽³⁵⁾ Se enfatiza lo anterior, dado que su empleo es muy promocionado comercialmente como control crítico en medicina de urgencia para establecer una correcta identidad humana, limitando o evitando alergias medicamentosas ante la ausencia de datos clínicos de los pacientes.⁽³⁵⁾

Bajo un análisis integral de la identificación animal, se considera que deber ser tanto fácil de implementar como leer para permitir determinaciones eficaces, dado que los procesos experimentales usualmente requieren comparaciones precisas de control entre individuos idénticos ⁽²⁴⁾ (cepas de ratas, ratones albinos, etc.); al mismo tiempo, deberá permitir al personal lecturas breves sin invertir un tiempo excesivo y el uso de equipos costosos.⁽⁷⁾ En un último examen deberá ser un método benigno para los animales, sin causarles efectos adversos temporales o irreversibles, ^(29, 30, 36, 37, 38) que no fueren más allá de una ligera molestia al ser removidos de sus jaulas. Se resalta esto último, dado que en investigación el manejo excesivo de animales resulta en alteraciones metabólicas que afectan la respuesta biológica del individuo.^(2,39)

De acuerdo con lo anterior, en este trabajo se desarrolló un método novedoso para la identificación y control individual de cobayos basado en las diferencias morfológicas que poseen sus patrones vasculares auriculares. Dicho proceso constituye una metodología análoga ampliamente validada en la criminalística y la seguridad mediante el estudio y empleo de las huellas dactilares,⁽⁴⁰⁾ existiendo además descripciones de su uso en tejidos vasculares de plantas ^(41, 42, 43,44) y alas de los insectos,⁽⁴⁵⁾ orientadas a especificar su caracterización taxonómica y la diferenciación de especie. Es por ello, que por simple analogía este método permitirá discernir los patrones básicos de la venación auricular y beneficiar tanto a veterinarios como investigadores, quienes podrán con ello determinar las identidades individuales de cobayos caracterizando los patrones venosos de este modelo.

Este beneficio tácito evitará el empleo de métodos tradicionales laboriosos, costosos e invasivos.^(14,18,46) Se estima asimismo que la caracterización propuesta podrá favorecer la conformación de un Manual Práctico que ilustre los patrones distintivos del cobayo, y con ello facilitar una identificación individual rápida, segura y reproducible en los bioterios o laboratorios por cualquier persona previa revisión del método.

JUSTIFICACION

La identificación eficaz de cobayos nos instó a la búsqueda de métodos alternativos considerados por los comités de Ética como aceptables, en adherencia con las directivas de Refinamiento y Bienestar Animal, fáciles de implementar y leer rutinariamente. Dicha estrategia condujo a descubrir que estos pequeños roedores poseen una venación distintiva en sus orejas, constituyendo primariamente una compleja y diversificada trama venosa que se redefine en ramas menores con variaciones reticulares únicas entre cada animal, de manera análoga a las huellas dactilares humanas o bien a la imagen retinal,^(40, 47) motivo de amplia investigación. Ello, independientemente de que en el campo de la diferenciación venosa se han publicado extensos sistemas para el estudio tridimensional de intrincados sistemas venosos de plantas e insectos,^(42,43) concretamente de los lechos vasculares que distinguen a las hojas y alas de diversos modelos de moscas.⁽⁴⁸⁾

Esta interesante observación, sumada a la necesidad de lograr la identificación eficaz de la especie sirvió de base para caracterizar sus patrones venosos auriculares, que están conformados bajo características constitucionales genéticamente determinadas desde el nacimiento.⁽⁴⁹⁾ La variación morfológica se analizó individualmente con el apoyo de un *software* de uso libre en la Internet.⁽⁵⁰⁾ Dicho método especializado en el enriquecimiento de imágenes fotográficas usó procesos computacionales de alta definición y calidad, realizando y documentando rasgos anatómicos vasculares de cada animal, cuyos atributos fueron definidos a través del cuidadoso mapeo tridimensional determinado por el propio operador; un abordaje nunca antes reportado en el cobayo de laboratorio.

HIPÓTESIS

La existencia de diferencias morfológicas discernibles entre los patrones vasculares auriculares del cobayo de laboratorio (*Cavia porcellus*), permitirá definir la identidad individual de cada sujeto estudiado.

OBJETIVO

Desarrollar un método seguro, reproducible y económico de carácter no invasivo para la identificación y control eficaz del cobayo de laboratorio (*Cavia porcellus*) mediante el mapeo, caracterización y documentación fotográfica de sus patrones venosos auriculares.

MATERIAL Y MÉTODO

Animales

En el presente estudio se emplearon 100 cobayos albinos de la cepa Dunkin Hartley de dos meses hasta un año de vida de ambos géneros. De los individuos seleccionados 48 % correspondieron a machos y 48 % hembras. Cuatro animales fueron retirados del estudio por haber sufrido mordeduras excesivas en algunas de las etapas del mismo; estos sujetos correspondieron a los Lotes 7 y 8 de más de 8 meses de vida. Los grupos finales se conformaron con 12 sujetos cada uno (6 machos x 6 hembras) y se establecieron lotes de edad uniforme: **Lote 1** (2 meses), **Lote 2** (3 meses), **Lote 3** (4 meses), **Lote 4** (5 meses), **Lote 5** (6 meses), **Lote 6** (7 meses), **Lote 7** (8 meses) y **Lote 8** (12 meses). Todos los cobayos fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez (I.N.C.I.Ch.) sito en Juan Badiano No 1 Sección XVI, Tlalpan, 14080 DF, siendo alojados en el Bioterio del mismo en jaulas de policarbonato transparente de 50 x 50 cm, bajo las siguientes constantes ambientales: temperatura de $21\pm 1^{\circ}$ C, ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas y humedad relativa del 55-65%. Todos los sujetos fueron alimentados *ad libitum* con agua y una dieta comercial peletizada* y cada lote identificado con tarjetas de jaula, alojando grupos de 6 hembras y 6 machos preferentemente de la misma edad (Figura 1).

* Guinea Pig Chow 5025, PMI Feeds, Inc., St. Louis, MO, USA.

Una vez organizados para su estudio la mayoría de los cobayos fueron retirados manualmente de sus jaulas sin sedar, por constituir un estudio observacional no invasivo y de orden morfológico.

Los escasos sujetos notablemente inquietos fueron sedados vía IM con Xilazina HCL (3mg/Kg de peso), y posteriormente retroiluminados para su fotografía individual.

Para la captura fotográfica se utilizó una lámpara de diodos emisores de luz (LEDs), permitiendo evaluar los lechos venosos y obtener una breve fotografía empleando de 5-7 minutos para cada uno (Figura 2). Los criterios de inclusión fueron para animales sanos de edad y sexo determinado por el protocolo, mientras que se excluyeron los enfermos, de edad diferente a la estipulada y sufriendo de trauma auricular extenso.

Método de Retro-Iluminación y Obtención de Imágenes

Los cobayos fueron colocados sobre una mesa de acero inoxidable para su contención manual, procediendo a su retro-iluminación sobre un fondo negro, utilizando una lámpara de luz fría para discernir los patrones vasculares de las orejas. Cada imagen fue capturada con una cámara digital marca Kodak Modelo Easy Share Z 650⁽⁵¹⁾ con capacidad de 6.1 mega pixeles y un Zoom óptico de 10X. Al término de las manipulaciones cada sujeto se reintegró a su jaula.

Nota: Tanto el manejo animal como la documentación fotográfica no precisaron de un entrenamiento especial para el tesista.



Figura 1. Alojamiento para cobayos cepa Dunkin Hartley.



Figura 2. Método de Retroiluminación

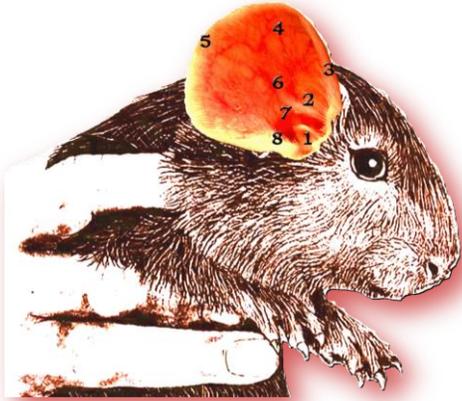


Figura 3. Regiones Anatómicas del Oído:
 1. Trago, 2. Supratrago, 3. Subhélix,
 4. Antehélix, 5. Concha, 6. Hélix,
 7. Raíz del Hélix, 8. Antitrigo.

En este estudio se analizó el pabellón auricular (Figura 3), compuesto por una placa delgada de fibrocartílago móvil, encargado de captar la audición en la mayoría de los mamíferos.⁽⁵²⁾ Las orejas se fotografiaron en dirección cráneo-dorsal, permitiendo que el haz de luz iluminara de frente la cara de los animales aumentando la nitidez de los vasos sanguíneos.

La morfología venosa de las imágenes se definió considerando los patrones de la red vascular plana que irriga el pabellón auricular, capturado fotográficamente. Las imágenes seleccionadas fueron detalladas individualmente; para ello se retiró el pelo excedente y se esqueletonizó cada oreja para su caracterización en 3D empleando una Interface para estudio gráfico denominada **Analysis Framework Graphical Interface**.⁽⁵⁰⁾

Dicho recurso de uso libre en la Internet (fines académicos) constituye un complejo programa de procesamiento y análisis de imágenes, perfeccionado por The NIH Image Program.⁽⁵⁰⁾ El adelgazamiento de la matriz venosa resultó en imágenes muy contrastadas y de alta calidad, finalmente realizadas en 3D y comparadas con sus controles originales, estableciendo así una clasificación básica inherente a los patrones venosos encontrados (Cuadros 1 y 2).

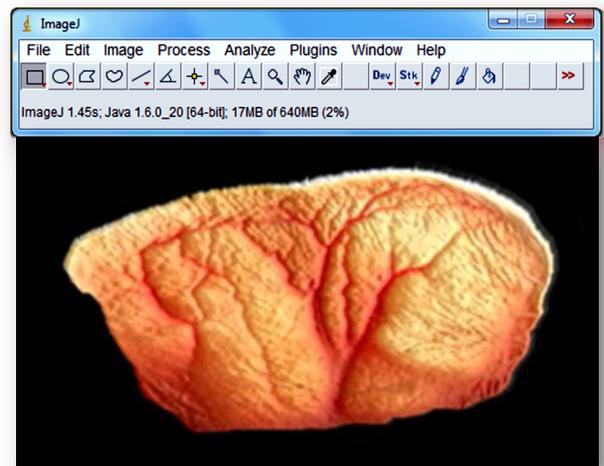


Figura 4. Imagen esqueletonizada en 3D de la oreja del cobayo (*Cavia porcellus*).

RESULTADOS

El análisis de imágenes simples en color y realizadas en 3D de las orejas, demostró mediante eskeletonización que los lechos venosos forman un patrón siempre diferente y disperso, aún en un mismo animal, ostentando así una notable asimetría morfológica en el 99 % de los sujetos (Figura 5).



Figura 5. Asimetría comparativa de la venación auricular del cobayo (*Cavia porcellus*).

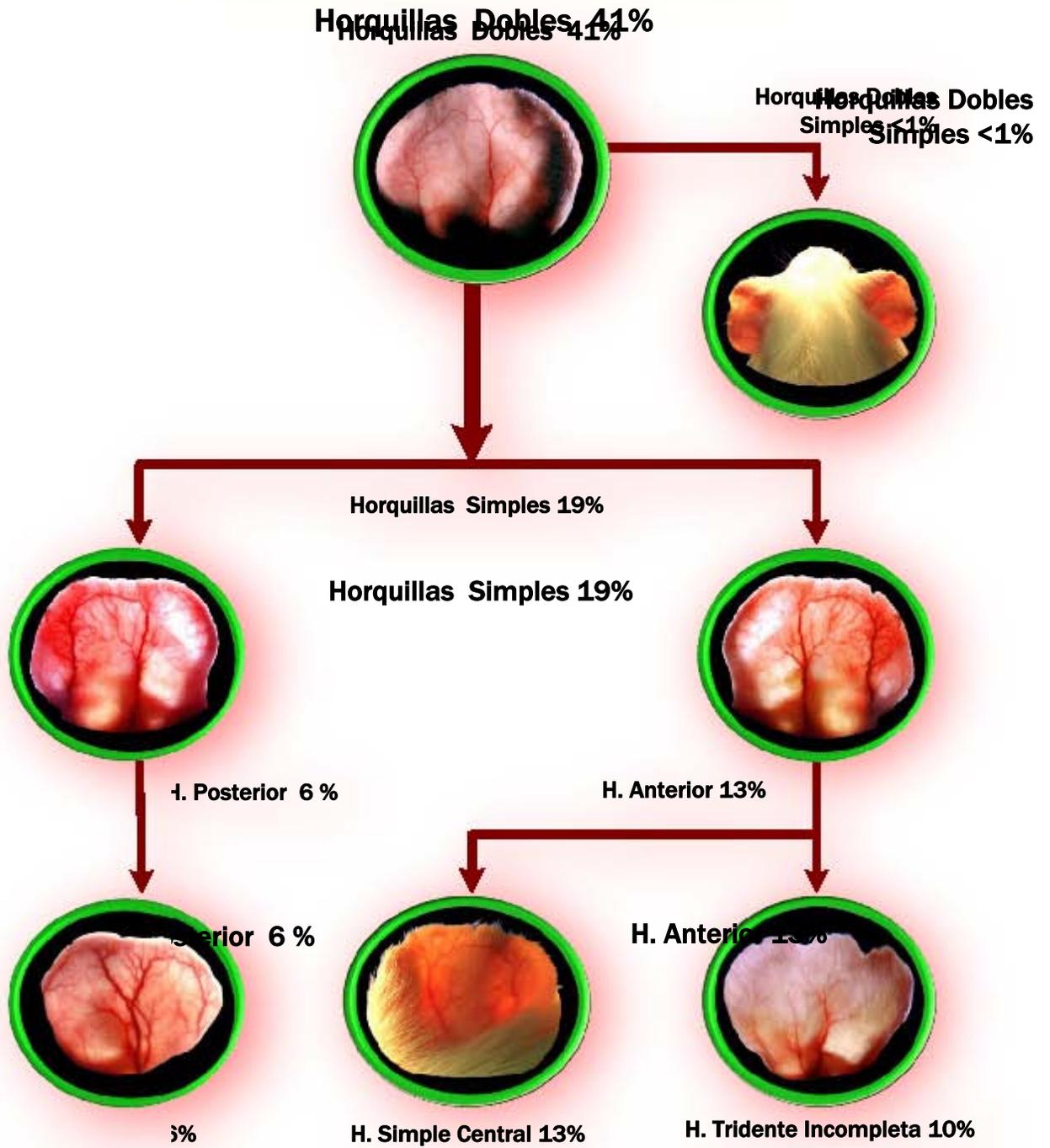
Los vasos sanguíneos formaron en su trayecto árboles vasculares singulares desde la base hasta el *ápex*, proyectando así Horquillas Primarias Simples o Dobles, que variando en tamaño y forma surgían de una vena medial, dando origen a vénulas más angostas accesorias y conformando mallas complejas caracterizadas como secundarias.

Los datos Primarios registraron la presencia de Horquillas Dobles en el 41% de los sujetos y tan solo 1% de Horquillas Dobles-Simples, destacando valores de 19% para las Horquillas Simples e incluyendo en este valor tanto las horquillas anteriores (13%) como posteriores (6%). Los criterios Secundarios demostraron importantes disparidades en la conformación de los lechos venosos de origen Primario, encontrando 16% de Horquillas en Tridente, 13% de Horquillas Simples Centrales y 10% de Horquillas en Tridente Incompletas, permitiendo una diferenciación macroscópica de cobayos en un 60% para la Caracterización Primaria y del 78% con respecto a la Caracterización Secundaria. Estos hallazgos permitirán al usuario conocer la identidad de hasta el 100% de sus cobayos usando criterios estándar, pudiendo así establecer más de 10,500 combinaciones dada la enorme diversidad existente (Cuadro 1).

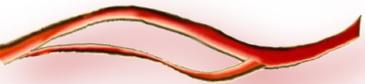
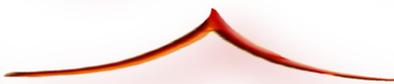
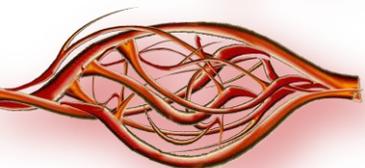
Otros patrones complementarios mostraron trayectos venosos en forma de letras “**T**”, “**Y**”, “**V**” y “**Delta**”, que a su vez formaron modelos de tipo linear rectos, simples e irregulares, angulados, sigmoides, en laguna simple o doble, bifurcados, en forma de árbol e insulares o bien con ramales venosos ondulados o escotados (Cuadro 2).

Cuadro 1

**ANATOMÍA PORCENTUAL DE LA
CIRCONFERENCIA DEL CÍRCULO PAORRICE NYUSE CUEN DAA R IA
N DEL COBAYO (C. y p SECUNDARIA
DEL COBAYO (C. porcellus)**



Cuadro 2

| PATRONES COMPLEMENTARIOS DE LA VENACIÓN AURICULAR DEL COBAYO (<i>C. porcellus</i>) | |
|--|---|
| CRITERIOS DE 1ER Y 2O ORDEN VASOS SANGUÍNEOS SENCILLOS | CRITERIOS DE 3O Y 4O ORDEN VASOS SANGUÍNEOS COMPUESTOS |
| Angulado  | Bifurcado  |
| Escotado  | Duplicado  |
| Ondulado  | Insular  |
| Pinzado  | Ramificado  |
| Recto  | Reticular Complejo  |
| Recto Irregular  | |

CAPACIDAD DE DISCRIMINACION DEL SISTEMA
TOTAL DE PATRONES OBSERVADOS: 7 (UNO CON 6 SUBTIPOS) X 2 OREJAS = 14 MODELOS
RASGOS SEGMENTARIOS SENCILLOS: 6 X 5 SEGMENTOS = 30 MODELOS
RASGOS SEGMENTARIOS COMPUESTOS: 5 X 5 SEGMENTOS = 25 MODELOS
POSIBILIDADES DE RASGOS: 14 X 30 X 25 = 10,500 PATRONES VENOSOS DIFERENTES

Los hallazgos del estudio incluyeron el modelado en 3D, lo que definió de manera realzada las secuencias de contornos que construyen cada detalle morfológico distintivo (Figura 6). Las comparaciones anatómicas demostraron variaciones definitivas entre cada individuo, mismas que fueron efectuadas con base en el mapeo de los lechos venosos y con respecto asimismo a la estructura macroscópica vascular entre los 96 sujetos estudiados.



Figura 6. Lechos Auriculares Vasculares en 3D.

Nótese: **Un Árbol Central** emitiendo ramales conformando una horquilla anterior completa.

Una Laguna Central doble en tridente ascendente.

Un Ramal Irregular Recto Central, discurriendo en troncos anteriores y otros lechos menores distintivos.

Se estima que tanto la identificación, como el control efectivo del sujeto se pueden alcanzar por medio del dibujo simple de la estructura venosa encontrada en cada animal. Esto se podría incorporar a su propia tarjeta de jaula al inicio de cada estudio, ya sea en una tarjeta pre-impresa o bien en registros individuales preparados *ad hoc*, usando un procedimiento sencillo que precisa menos de un minuto para su conclusión (Figura 7).

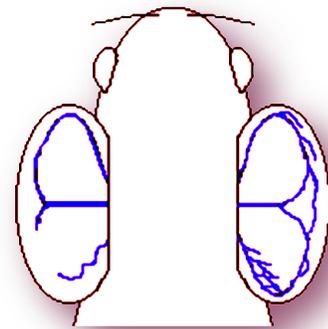


Figura 7. Propuesta para Elaboración de Tarjeta para la Identificación y Control Animal

Por otro lado, mediante comparación directa se estimó que la aplicación del sistema descrito es superior a los métodos tradicionales de tinción o marcaje animal que precisan de 4 o más minutos por sujeto, y suelen ser temporales, dado que al sufrir la perforación de la membrana auricular los cobayos responden con fuertes vocalizaciones y un vigoroso pataleo de miembros posteriores; ello se traduce en estrés y fuertes arañazos para el propio operador, lo que se debe sumar al doloroso desprendimiento de las uñas en cobayos, ratas y ratones en menor proporción. Consecuentemente, la bondad de determinar la identidad del cobayo vía una breve lectura de su venación auricular es considerable en términos de tiempo y bienestar animal.^(4,11)

DISCUSIÓN

Considerando el papel intrínseco que juega la venación como una matriz que físicamente regula el flujo de fluidos en plantas,^(42,43,44) mamíferos⁽⁵³⁾ (Figura 8) y otros modelos inferiores, se pensaría que dada su importancia debiera existir un número importante de descripciones científicas y de tipo anatómico destacando los finos detalles de sus contornos y lechos vasculares únicos. Sin embargo, desafortunadamente este no es el caso, por lo que derivado de la búsqueda en la bibliografía solo se encontraron descripciones de temas anatómicos en cobayos,⁽⁵³⁾ incluyendo los extensos reportes de la circulación humana, arterias coronarias y otros sistemas venosos relevantes.^(54, 55)

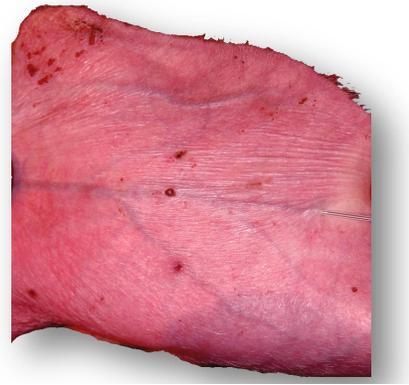


Figura 8. Venación típica de la oreja del cerdo (*Sus scrofa*), Se observan rama central en tridente y troncos laterales.

Los datos recolectados señalan una variación elevada con la presencia de Horquillas Dobles del 41% y distintivamente una mínima, pero importante disparidad del 1% para Horquillas Dobles Simples dentro del grupo estudiado, lo que sugiere una rareza ya que no se volvió a detectar este rasgo en nuestra muestra. Los valores Secundarios mostraron variaciones significativas del 13% y del 6%, totalizando 19% para los criterios de Horquillas Simples tanto Anteriores como Posteriores, mientras que la venación ulterior ilustrada en el Cuadro 1 demostró característicamente diferencias Secundarias de Horquillas en Tridente del 16%, Horquillas Simples Centrales del 13% y en Tridente Incompletas del 10%. Todo ello aporta grados de diferenciación elevados, superiores al 65% para cada criterio, validando la capacidad de discriminación del método⁽⁵⁶⁾ señalada en el Cuadro 2.

Se estima por otro lado, que las numerosas observaciones de los patrones auriculares de cobayos permitieron ampliar descripciones previas,^(48, 55) y redefinir que las estructuras en forma de árbol observadas en todos los sujetos como una red distribuida de manera irregular, estuvieron presentes en los trayectos venosos auriculares particularmente no homogéneas, conteniendo lechos y ramas secundarias notoriamente diferentes, tanto en

tamaño como forma y calibre, de manera análoga a la venación observada en roedores y cerdos. ^(7, 38, 57)

Es importante hacer notar que estos mismos sistemas venosos han sido ampliamente descritos para las hojas de las plantas, ⁽⁴¹⁻⁴³⁾ así como en las alas de insectos comunes (mosca *Drosófila*). ⁽⁴⁵⁾ (Figuras 9 y 10).

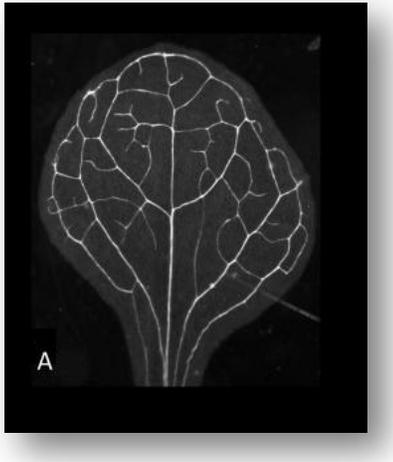


Figura 9. Venación característica de los pétalos de *Arabidopsis thaliana* analizadas con un Software de uso libre en Internet.

Figura Modificada de:
Donner TJ, et al, 2009. ⁽⁵⁸⁾



Figura 10.
Venación característica de las alas de la mosca doméstica o común (*Musca domestica*).

Se anticipa que este estudio biométrico permitirá la lectura de los patrones venosos de las orejas de los cobayos con simplicidad y seguridad, considerando que se desarrollan de manera natural desde el nacimiento. Este hecho constituye una característica morfológica constante y genéticamente determinada; una peculiaridad única que confiere propiedades vasculares estables inalterables en el tiempo, ⁽⁴⁹⁾ lo que significa que los patrones venosos son invariables de por vida como las huellas dactilares humanas ^(40, 59) a excepción de que se alterasen por enfermedad o trauma, lo que a su vez resultaría en comparaciones sólidas reportadas previamente. ^(7,17, 38)

Dichas ventajas anatómicas han sido asimismo observadas como útiles para la identificación individual del ganado y cerdos (Figura 8), especie propuesta por la certeza que aporta este método no invasivo.^(55,58) Se destaca que en el caso de esta última especie, la visión de largo alcance de los autores propuso el empleo de dispositivos electrónicos tipo GPS para efectuar con seguridad su rastreo en granjas productoras de gran tamaño.^(57, 60) Dichas vicisitudes apoyan nuestros hallazgos basados en la identificación positiva y segura de las intrincadas redes venosas auriculares, que se ha demostrado caracterizan al cobayo análogamente a varios ejemplos,^(7, 17, 56) y para los cuales no se cuenta a la fecha con descripciones anatómicas particulares aunque existen datos morfológicos describiendo el oído medio e interno en investigación de la audición, incluyendo un extraordinario Atlas ilustrando complejos aspectos anatómicos.^(61,62) En el caso de los ratones existe una cantidad importante de estudios reportando datos anatómicos, en donde se destacan los reflejos acústicos.⁽⁶³⁾

Los trabajos que describen métodos para la identificación de animales de laboratorio se basan mayoritariamente en técnicas invasivas,^(13,14) extensamente reportadas como capaces de generar serias objeciones y prohibiciones a partir de los CICUALES en el mundo,^(8, 31, 64) dado que sus integrantes están conscientes de la naturaleza dolorosa de la mutilación de dedos y el cartílago de las orejas,^(28, 29, 65) que lamentablemente continúan en uso en prácticamente cualquier institución de investigación o enseñanza.

Los resultados de esta tesis superan el uso cotidiano de los aparentemente inocuos microchips, que aunque están encapsulados al ser inyectados en un animal emiten ondas de radio frecuencia muy eficaces,⁽³⁴⁾ que precisan de costosos equipos electrónicos para su lectura; empero, más importante es el hecho de que los microchips han generado serias dudas acerca de su seguridad en animales y humanos derivado de reportes destacando su capacidad carcinogénica nunca antes considerada.⁽³⁵⁾ Ello es preocupante, dado que dichos dispositivos están en uso desde los años 80s, no solo en animales de laboratorio sino también en ganado y diversas mascotas.^(32,33)

Se estima como algo posible, que en el nombre de la modernidad se llegara a promover comercialmente de forma intensiva el uso de dispositivos electrónicos (*microchips*) para su

implante humano en los años venideros, tendiendo según las grandes corporaciones a reducir o eliminar lo que se han llamado prácticas hospitalarias arcaicas, con el pretexto de resolver la frecuente falta de información e identificación positiva de pacientes en las salas de emergencia, lo que con frecuencia ha resultado en muertes inesperadas por carecerse de perfiles de salud y datos de alergias medicamentosas.⁽³⁵⁾

En nuestro caso la identificación de cobayos se desarrolló en tiempos cortos, menores a 3 minutos, tanto por investigadores como por cuidadores de animales que incurrían en frecuentes errores para hacerlo en forma acertada usando otros sistemas. Pero en particular con un grado muy alto y dudoso de confiabilidad y tiempo, superando los 5-6 minutos. La alta variabilidad observada de oreja a oreja y de animal a animal, resultó crítica en la muestra analizada para validar identidades y resultados experimentales.^(7,17)



Figura 11. Venación auricular central de *Cavia porcellus*, mostrando mordisqueo en el borde posterior de la oreja.

Algunos de los principales obstáculos encontrados incluyeron la excesiva mutilación de orejas derivado del frecuente mordisqueo entre cobayos (Figura 11), lo que resultó en la pérdida de aretes e identidad, o bien en infección subsecuente, que en casos extremos se ha reportado como una severa condritis auricular en roedores.⁽⁶⁶⁾

Durante este estudio los cobayos fueron distribuidos en pequeños grupos en lugar de alojarlos individualmente, evitando con ello el síndrome de aislamiento.⁽⁶⁷⁾ Sin embargo, existen resultados controversiales destacando la llamada ansiolisis en ratones reportada por Pietropaolo S, et al 2008,⁽⁶⁸⁾ apoyando la necesidad de métodos no invasivos como el propuesto por este trabajo.

Por otro lado, no siendo seguro el empleo de tinciones para el marcaje e identificación temporal así como otros métodos costosos, nuestro procedimiento propone inicialmente el

estudio morfológico de la venación auricular del cobayo como un sistema alternativo no invasivo fácil de implementar y leer, en un intento por definir los contornos venosos y su proporción radial que constituyen un vasto universo de posibilidades como ha sugerido Cameron, J. et al, 2007b ⁽⁷⁾ con el empleo de métodos biométricos, lo que permite caracterizar individualmente a cada animal. Paralelamente, nuestro estudio constituyó un análisis cualitativo y observacional de las numerosas venaciones observadas, orientado a determinar la variación morfológica porcentual de los lechos vasculares y sus recorridos en la muestra bajo estudio. Dichos hallazgos son reportados con alta calidad ilustrativa en el Cuadro 1, que define las venaciones porcentuales Primarias y Secundarias, mientras que los Patrones Complementarios tanto Sencillos como Compuestos de 1er, 2º, 3º y 4º Orden, se muestran bien conformados en el Cuadro 2.

De acuerdo con nuestros análisis y los tiempos empleados, se estima que bajo los criterios estándar sugeridos el riesgo de falsa identidad es prácticamente nulo o cercano a cero. Consecuentemente, se postula tal como se ha sido sugerido ⁽⁷⁾ que en forma práctica y estrictamente observacional los analistas podrían preparar representaciones rápidas del árbol venoso del sujeto en dos o tres minutos, favoreciendo su identificación expedita. Esto último auxiliaría al investigador para contar con un abordaje didáctico de la especie, al proveerle con imágenes básicas comparativas de cada venación al inicio de un estudio (Figura 7). Se estima que existiendo una gran variación morfológica entre cada oreja, y de animal a animal, sería posible que solo se precisara registrar un solo ejemplo por cobayo reduciendo los tiempos de registro y control.

Con respecto al modelado en 3D, se hace notar que estas técnicas permitieron realzar y definir con exactitud numerosas imágenes altamente contrastadas, ⁽⁵⁰⁾ facilitando la nítida visión de los contornos venosos y la lectura de finos detalles morfológicos que determinan la identidad de cada animal. Dichas imágenes, análogamente al sistema de figuras fotográficas observaron una conformación innata, destacando un retículo venoso complejo en cada individuo desde su nacimiento hasta la edad madura. ⁽⁴⁹⁾ Este abordaje confirió gran simplicidad de lectura, identificación y control para manejadores de animales así como investigadores.

En última instancia, se considera que la morfología auricular estable que caracteriza de por vida a los animales ⁽⁴⁹⁾ se podría complementar con métodos biométricos perfeccionados para su uso en pequeños roedores, un aspecto sugerido previamente.^(7,17) Lo anterior se estima factible si ello fuese conformado como una colección ilustrada tipo Atlas por cada especie, para definir fotográficamente los patrones Primarios, Secundarios y Terciarios, y comparando las imágenes a color y en 3D con el auxilio de cualquiera de los Software de uso libre en Internet.⁽⁵⁰⁾ Dicho esfuerzo deberá perfeccionarse estableciendo una nomenclatura que permita validar y autenticar los patrones morfológicos para constituir una contribución paralela y sólida en el campo de la anatomía comparada.*

CONCLUSIONES

1. El presente trabajo describe un método novedoso capaz de determinar eficazmente la identidad de cobayos de laboratorio, sin recurrir a prácticas invasivas.
2. El sistema se basa en el análisis breve de las características auriculares captadas mediante diversas imágenes fotográficas, que establecen diferencias morfológicas y con ello diferentes modelos de venación entre cada individuo (Figuras 12-16).
3. La identidad determinada visualmente puede ser plasmada objetivamente registrando un simple ejemplo gráfico para cada cobayo, reduciendo los tiempos para registro y control animal con prácticamente cero errores.

*Aja Guardiola A. Comunicación personal, 2012.



Figura 12. Mapeo Auricular

OD: Horquilla derecha posterior con árbol central emitiendo numerosas ramas en “V” e “Y”; laguna central anterior.

OI: Árbol central anterior bifurcado en tridente formado una “Y”; mostrando dos ramales posteriores.

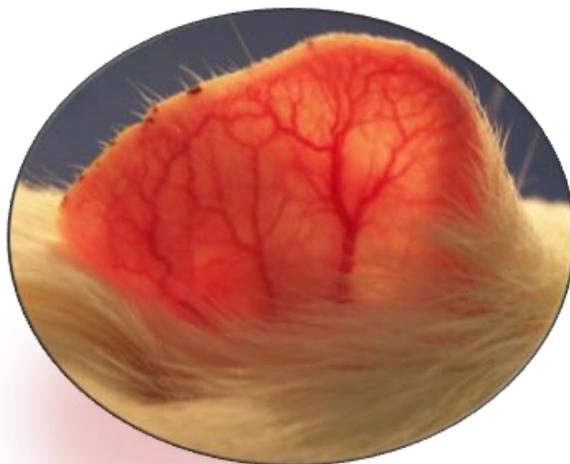


Figura 13. Mapeo Auricular

OD: Horquilla central difusa, provista de árboles interiores emitiendo numerosas ramas irregulares en tridente, y trayectos cortos escotados o angulados formando tres lagunas en su trayecto.

OI: Horquilla central; ramas posteriores bifurcando en “Y”, y tridente formado lagunas superiores con varios ramales posteriores ondulados. Existe una trama vascular superior a las 12:00.

Figura 13a. Acercamiento



OI: Horquilla central amplia. **Tres troncos;** derecho doble en laguna prolongada, y laguna lateral en complejo reticular difuso; nótese tronco central bifurcado en tridente formando lagunas superiores.

Tronco lateral con trayecto ondulado irregular y escotado, del complejo reticular. Son notables las cicatrices del borde externo por mordedura.



Figura 14. Mapeo Auricular Sin iluminación.

OD: Horquilla derecha posterior discreta con un árbol central emitiendo un ramal en “V” y un trayecto contorneado mostrando una laguna central.

OI: Horquilla amplia anterior con bifurcado en laguna superior.



Figura 15. Mapeo Auricular

OD: Horquilla central simple nítida; con árboles interiores emitiendo ramas irregulares en tridente y trayectos cortos rectos e irregulares, formando laguna central en su trayecto.

OI: Horquilla central simple; ramas posteriores anguladas que se bifurcan en “Y”, y en tridente. Trayecto posterior discretamente ondulado.

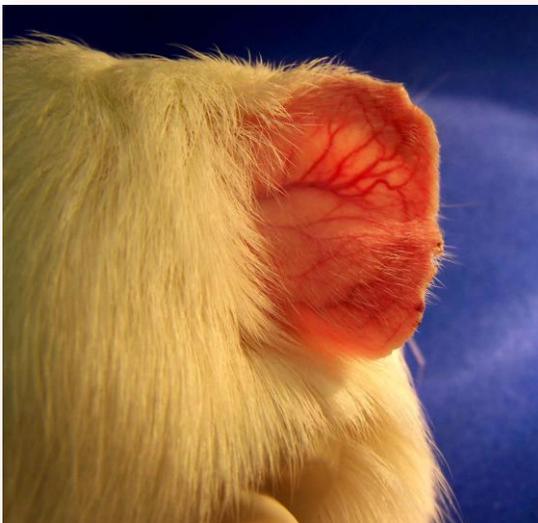


Figura 16. Mapeo Auricular

OD: Horquilla central marcada por un profuso complejo reticular; un árbol central de mayor calibre ondulado, emitiendo 6 ramales en “V”, “Y” de trayectos cortos y largos irregulares, ondulados y sigmoideos con numerosas tramas formado lagunas anteriores y de tipo posteriores.

Venación central discreta de tipo ramificada y bifurcada en “Y”.

BIBLIOGRAFÍA

1. NIH, Medical Research with Animals. NIH Publication No 08-6436. Available from URL: <http://science.education.nih.gov/animalresearchfs06.pdf>
2. Öbrink KJ, Rehbinder C. The defined animal. *Scand. J. Lab Anim Sci* 1993;20:5-9.
3. Öbrink KJ, Rehbinder C. Animal definition: a necessity for the validity of animal experiments? *Lab Anim* 2000; 34:212-130.
4. Aluja A. La experimentación científica en animales y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-199). *Gac Med Mex* 2002;1383:295-298.
5. Vanda CB. La experimentación biomédica en animales en los códigos bioéticos. *Laborat- acta* 2003; 2:69-93.
6. FDA Consumer. Vaccines and the Law. 1994;28:13-38.
7. Cameron J, Jacobson C, Nilsson K, Rognvaldsson T. Identifying Laboratory Rodents Using Earprints. *National Centre for Replacement, Refinement, and Reduction of Animals in Research (NC3Rs)* 2007b;11:1-4.
8. Robinson V (ed.). Sixth report of BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement: Refinement and reduction in production of genetically modified mice. *Lab Anim* 2003;37:1-51. Available at URL: <http://www.lal.org.uk/pdf/files/Transgenic.pdf>
9. CCAC. Canadian Council on Animal Care. Marking. In: *The 3R's Good Animal Practice in Science. Care and Techniques Procedures*. Available from URL: <http://3rs.ccac.ca/en/care-and-techniques/ct-procedures/marking.html>
10. CCAC. Canadian Council on Animal Care. *Guide to the Care and Use of Experimental Animals. Vol. I*. Edited by The Canadian Council on Animal Care. Ottawa, Ontario K1P 5H3, Canada 1993.
11. NIH. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th Edition*. Institute for Laboratory Animal Research, Division on Earth and Life Studies. NRC, National Academies Press. Washington, D.C. 2011.
12. FDA, Department of Health and Human Services (DHHS). Subchapter A- General. *Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies (21 CFR Part 58) CFR - Code of Federal Regulations Title 2*. Available from URL: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?cfrpart=58>
13. Bivin WS, Smith GD. *Techniques of Experimentation, Laboratory Animal Medicine*. Academic Press, Inc. New York, USA, 1984:563.
14. ARAC Guidelines. Office of Animal Care and Use (OACU). *Guidelines for Toe Clipping of Rodents*. Available from URL: <http://oacu.od.nih.gov/ARAC/index.htm>

15. Harkness JE, Wagner JE. The Biology and Medicine of Rabbits and Rodents; 3rd Edition, Lea and Febiger, Philadelphia, PA 1989.
16. NIH (NRC) National Research Council. Laboratory Animal Records. A Report of the Committee on Laboratory Animal Records. Washington, D.C. National Academy Press 1979.
17. Cameron J, Jacobson C, Nilsson K, Rögnvaldsson T. A biometric approach to laboratory rodent identification. *Lab Anim* 2007a; 363:36-40.
18. Nieves S, Guillen J, Peralta JM. Capítulo 6. Identificación Animal y Marcaje. Zúñiga, JM, Orellana MJM, Tur MJ. Universidad de Alcalá, SECAL. Ciencia y Tecnología del Animal de Laboratorio. Europa Artes Gráficas, Salamanca, España 2008.
19. Wildes RP. Iris Recognition: An Emerging Biometric Technology. *Proceedings of the IEEE* 1997; 9:1248-1363.
20. Gonzales-Barron U. Ward S. Review of biometric and electronic systems of livestock identification. The BioTrack Project. Development of a protocol for biometric-based animal tracking and tracing Biosystems Engineering, University College Dublin Earlsfort Terrace, Dublin 2, Ireland, 2005. Available from URL: www.ucd.ie/bioresources/.../Biometrics.doc
21. Chen D, Wu Z. Study on Extraction and Purification Process of Capsicum Red Pigment. *J Agric Sci* 2009; 1:94-100. Available from URL:<http://www.ccsenet.org/jas>
22. Barber AN, Geer JC. Studies on the teratogenic properties of trypan blue and its components in mice. *Embryol Exp Morph* 1994; 12: 1-14.
23. Ounpraseuth S, Rafferty TM, McDonald-Phillips RE, Gammill WM, Siegel ER, Wheeler KL, Nilsson EA, Cooney CA. 2009. A method to quantify mouse coat-color proportions. *PLoS ONE* 2009; 4:5414.
24. Benavides F, Glasscock E, Coghlan LG, Stren MC, Weiss DA, Conti CJ. PCR-Based microsatellite analysis for differentiation and genetic monitoring of nine inbred SENCAR mouse strains. *Lab Anim* 2001; 35:157-162.
25. Salisbury FW. The Inheritance of Equine Coat Color: The Basic Colors and Patterns. *J Hered* 1941;32: 235-240.
26. Trommershausen-Smith A, Suzuki Y, Stormont C. Use of blood typing to confirm principles of coat color genetics in horses. *J Hered* 1976;67:6-10.
27. Castelhana-Carlos MJ, Sousa N, Ohl F, & Baumans V. Identification methods in newborn C57BL/6 mice: a developmental and behavioral evaluation. *Lab Anim* 2010; 44:88-103.
28. Padel S. Lowman S. Livestock management, physical operations/mutilations-UK Soil Association Organic Standards 2005. Available from URL: <http://organicrules.org/195/>
29. Wang L. A primer on rodent identification methods. *Lab Anim* 2005;34:64-67.

30. Kitagaki M, Shibuya K. Nylon Ear Tags for Individual Identification of Guinea Pigs *Contemp Top* 2004;43:13-17.
31. Schaefer D, Asner I, Seifert B, Bürki K, Cinelli P. Analysis of Physiological and Behavioral Parameters in Mice after Toe Clipping as Newborns. *Lab Anim* 2010; 44:7-13.
32. Gruda MC, Pinto A, Craelius A, Davidowitz H, Kopacka WM, Li J, Qian J, Rodriguez E, Kuspiel E, Mandecki W. A system for implanting laboratory mice with light-activated microtransponders. *Lab Anim Sci* 2010;49:826-31.
33. Geers R. ed. *Electronic identification, monitoring and tracking of animals*. CAB international, Wallingford, U.K. 1997.
34. Spiessl-Mayr E, Wendl G, Zähler M, Klindtworth K & Klindtworth M. Electronic identification (RFID technology) for improvement of traceability of pigs and meat. *Proc Precision Livestock Farming* 2005; 05: 339-345.
35. Albrecht K. Microchip-induced tumors in laboratory rodents and dogs: A review of the literature 1990–2006. In *Technology and Society (ISTAS), IEEE International Symposium* 2010:337-349.
36. Barron UG, Butler F, McDonnell K & Ward S. The end of the identity crisis? Advances in biometric markers for animal identification. *Irish Vet J* 2009;62: 204-208.
37. Nilsson K, Rognvaidsson T, Cameron J and Jacobson C. Biometric Identification of Mice. *18th International Conference of Pattern Recognition*. 2006;4: 465-468.
38. Bugge CE, Burkhardt J, Dugstad KS, Enger TB, Kasprzycka M, Kleinauskas A, Myhre M, Scheffler K, Ström S, Vetlesen S. 2010. Biometric methods of animal identification. Published by Adrian Smith, Compiled by Norecopa. Laboratory Animal Science Course, Norwegian School of Veterinary Science, February 2011. Available from URL: <http://www.norecopa.no>
39. Lindsey, J.R., M.W. Connor, and H.J. Baker. *Physical, Chemical and Microbiological Factors Affecting Biological Response in Laboratory Animal Housing*. National Academy of Sciences, Washington, DC. 1978;31-43.
40. Cole SA. *Fingerprint, Suspect Identities: A History of Fingerprinting and Criminal Identification*. Harvard University Press, 2009.
41. Aloni R. Differentiation of vascular tissues. *Annu. Rev. Plant Physiol* 1987; 38: 179–204.
42. Pietak AM. Describing long-range patterns in leaf vasculature by metaphoric fields. *J Theoret Biol* 2009; 261:279–289.
43. Bell A. The Vascular Pattern of a Rhizomatous Ginger (*Alpinia speciosa* L. Zingiberaceae) 1. The Aerial Axis and its Development. *Ann Botanic* 1980; 46:203-212.

44. Dhondt S, Van Haerenborgh D, Van Cauwenbergh C, Merks RM, Philips W, Beemster GT, Inzé D. Quantitative analysis of venation patterns of Arabidopsis leaves by supervised image analysis. *Plant J* 2012;69:553-63.
45. De Celis JF, Díaz-Benjumea J. Developmental basis for vein pattern variations in insect wings. *Int. J. Dev Biol* 2003;47:653-663.
46. Honma M, Iwaki S, Kast A, Kreuzer H. Experiences with the identification of small rodents. *Jikken Dobutsu* 1986; 35:347-52.
47. Rusk CP, Blomeke CR, Balschweid MA, Elliott SJ & Baker D. An evaluation of retinal imaging technology for 4-H beef and sheep identification. *J Extension* 2006: 44. Available from <http://www.joe.org/joe/2006october/a7.shtml>
48. Wolpert L. Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J Theor Biol* 1969;25:1-47.
49. Nadort A. The Hand Vein Pattern Used as Biometric Feature. Literature Thesis for Master of Science programme Physics of Life, Research Master of Study, Medical Natural Sciences at the Free University, Amsterdam. Feature Nederlands Forensisch Instituut, 2007. Available from URL: www.vip.aau.dk/wp-content/.../12/hand11.pdf
50. Ross J. Image J: introduction to Image Analysis. Biomedical Imaging Research Unit, School of Medical Science, Faculty of Medical and Health Science. The University of Auckland, NZ, 2012.
51. KODAK® easy share Z650, Zoom Digital Camera. KODAK Inc. USA, 2010.
52. Mc Cracken TO, Kainer RA, Carlson D. The Guinea Pig. In: *Color Atlas of Small Animal Anatomy: The Essentials*. Revised Edition. Wiley-Blackwell, 2009.
53. Awal MA, Aziz-Prodhan MA, Kurohmaru M, Matsumoto M, Hishinakagawa H. Microscopic studies on the arterial walls of main arteries supplying the mammary glands of guinea pig (*Cavia porcellus*) at different reproductive stages. *Vet Archiv* 2001;71:19-30.
54. Zamir M. Tree structure and branching characteristics of the right coronary artery in a right-dominant human heart. *Can J Cardiol* 1996; 12: 593-599.
55. Harrel RJ, Rusk CP, Richert BT. Identification of Swine by Auricular Vein Patterns, 2010. Available from URL: www.thejudgingconnection.com/pdfs/identification_of_swine_by_auricular_vein_patterns
56. Tena BE, Ramos LD, López PC, Bosque AC, Valdéz CP, Giménez-Scherer JA. Sistema de identificación de cobayos albinos por su patrón circulatorio auricular. *Memorias XVII Foro Nacional de Investigación en Salud*. Coordinación de Investigación en Salud, IMSS. Oaxtepec, Morelos 23-26 septiembre de 2008.
57. Stanford K, Stitt J, Kellar JA, McAllister TA. Traceability in cattle and small ruminants in Canada. *Rev Sci Tech* 2001;20:22-510.

58. Donner TJ, Sherr I, Scarpella E. Regulation of precambial cell state acquisition by auxin signaling in Arabidopsis leaves. *Development* 2009;136: 3235–3246.
59. Lennard CJ. History Of Fingerprinting. The Thin Blue Line Information Section 2008. Available from URL: <http://www.policensw.com/info/fingerprints/finger02.html> July 4 2008.
60. Roderick S, Hovi M. Animal health and welfare in organic livestock systems: identification of constraints and priorities. A report to MAFF, 1999. Available from URL:<http://www.organicvet.co.uk/cattleweb/health/MAFFOrgHealth.pdf>
61. Asarch R, Abramson M, Litton WB. Surgical anatomy of the guinea pig ear. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1975;84:250-255.
62. Treuting PM, Dintzis S, Liggitt D, Frevert CW. Special Senses: Ear. In: *Comparative Anatomy and Histology A Mouse and Human Atlas*, Academic Press, NY, 2011:419–432.
63. Saunders JC, Crumling MA, Chapter 8, The Outer and Middle Ear. In: *Handbook of Mouse Auditory Research: From Behavior to Molecular Biology*, James F. Willott, editor. CRC Press, Boca Ratón, Florida EUA, 2001:99-115.
64. CCAC (Canadian Council on Animal Care). Categories of Invasiveness in Animal Experiments. Ottawa, Ontario Canada. Report, 1989.
65. Hayden P. Identification methods for rodents (letters to the editor). *Lab Anim Sci* 1974;24:428-429.
66. Kitagaki M, Hirota M. Auricular Chondritis Caused by Metal Ear Tagging in C57BL/6 Mice. *Vet Pathol* 2007;44:458–466.
67. Shabanov PD, Lebedev AA, Nozdrachev AA. Social isolation syndrome in rats. *Dokl Biol Sci* 2004; 395:99-102.
68. Pietropaolo S, Feldon J, Yee BK. Nonphysical contact between cage mates alleviates the social isolation syndrome in C57BL/6 male mice. *Behav Neurosci* 2008;122:505-15.