



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**Diseño e Implementación de una Cámara de Dióxido de  
Carbono (CO<sub>2</sub>) dentro del Laboratorio de Evaluación de  
Fármacos y Medicamentos**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A :**

**DE LOS SANTOS HERNANDEZ ROCÍO  
Y  
TOQUERO ELIZALDE LUIS ARTURO**

**DIRECTOR DE TESIS: Q.F.B. ENRIQUE ESCALERA  
ZUÑIGA**

**DESARROLLO: Alternativas para el Correcto Manejo de los  
Animales de Experimentación para La Docencia**

**Ciudad de México 2017**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México, la cual me brindó la oportunidad de desarrollarme tanto académica como culturalmente y permitiéndome conocer y vivir todo lo que rodea a esta gran institución.

A mi querida Facultad de Estudios Superiores Zaragoza la cual me dio todo, en la que pase los momentos más agradables y también los más duros, donde realice mi formación académica, brindándome grandes conocimientos de profesores y amigos.

A mi director de tesis Q.F.B. Enrique Escalera Zúñiga. Por permitirme trabajar a su lado, por compartir su tiempo y sus conocimientos. Al igual que por sus paciencia y empeño en el desarrollo de este trabajo y a mis sinodales el Mtro. Valentín Islas, Mtra. Rosario Benítez, Mtra. Rosalba Barrera y al Dr. Osvaldo Castelán, por su apoyo, tiempo y dedicación que nos brindaron en este trabajo

## Contenido

Resumen.....	5
Introducción.....	7
Métodos Físicos .....	9
Dislocación Cervical .....	10
Decapitación.....	11
Irradiación con microondas .....	12
Métodos Químicos .....	13
Anestésicos Inyectables .....	13
Barbitúricos .....	14
Agentes Volátiles Inhalables .....	16
Nitrógeno (N <sub>2</sub> ) y Argón (Ar) .....	16
Dióxido de Carbono (CO <sub>2</sub> ).....	17
Combinación de Dióxido de carbono con otros agentes para inducir eutanasia ...	21
Animales de Laboratorio .....	21
Rata.....	22
Ratón.....	23
Calificación.....	24
Calificación de Diseño .....	25
Calificación de Instalación .....	25
Calificación de Operación.....	25
Calificación de Desempeño.....	26
Planteamiento del problema y Justificación .....	27
Hipótesis.....	28
Objetivos .....	29

Objetivo General .....	29
Objetivos específicos .....	29
Diseño Experimental .....	30
Material.....	31
Método .....	31
Resultados .....	35
Calificación de Diseño .....	35
Calificación de Instalación .....	36
Calificación de Operación.....	38
Calificación de Desempeño.....	39
Método de Eutanasia por medio de Cámara de CO <sub>2</sub> .....	39
Análisis de Resultados .....	42
Etapa de Diseño.....	42
Etapa de Instalación .....	43
Etapa de Operación .....	43
Etapa de Desempeño.....	44
Método de Eutanasia .....	45
Perspectivas.....	47
Anexos .....	48
Referencias .....	56

## Resumen

La gran mayoría de los animales utilizados para la investigación y pruebas mueren, ya sea porque se requieren sus tejidos u órganos al final de un estudio, o para el control de la población de aquellos animales que se reproducen de manera rápida o si no tienen un genotipo deseado. Se establecieron razones éticas y legales para garantizar que los animales de laboratorio se sacrifiquen de manera adecuada. Sin embargo hay debates sobre las técnicas de uso común, tales como el Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>).<sup>(1)</sup>

La eutanasia en roedores debe realizarse sin dolor y con la mayor eficacia posible, el método por dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) es inducido por asfixia y confirmado por dislocación cervical. La sobredosis de CO<sub>2</sub> favorece a la eutanasia, debido a la disminución del pH en el líquido cefalorraquídeo (LCR) secundario a la sobredosis de CO<sub>2</sub> se asocia con la profundidad anestésica y la insensibilidad al dolor en los seres humanos.<sup>(2, 3)</sup>

Es un método común para realizar la práctica de eutanasia en roedores es la asfixia, utilizando dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), que ha sido recomendado desde hace algún tiempo por la Federación de Universidades para el Bienestar Animal y la Asociación Americana de Medicina Veterinaria (AVMA).<sup>(4)</sup>

El objetivo de este trabajo fue la instalación de una cámara de gas (CO<sub>2</sub>) como método de eutanasia para animales utilizados en el Laboratorio de Evaluación de Fármacos y Medicamentos debió a que es un método permitido y humanitario muy fácil de utilizar el cual provoca un grado de inconsciencia y muerte en pocos minutos, pues se necesitan 10 minutos totales para provocar la muerte en ratas y 5 minutos en ratones, mediante el diseño y la instalación de una cámara que

suministra gas y siendo construida con una capacidad máxima de albergar 5 ratas y 12 ratones.

## Introducción

La eutanasia se define como el procedimiento humanitario empleado para terminar con la vida de los animales de laboratorio, sin producirles dolor, angustia o sufrimiento.

La eutanasia rápida de roedores de laboratorio sin el uso de anestésicos es una técnica de investigación necesaria, siempre que existe la probabilidad de que la anestesia o estrés en el animal pueda interferir con la química de los tejidos que son objeto de investigación.<sup>(5)</sup>

Desde la reunión de 2006, muchas regulaciones y / o directrices que rigen el uso de técnicas de matanza compasiva de los animales de laboratorio se han revisado, incluidos los aprobados por la Unión Europea y sus Estados miembros, la Asociación Médica Veterinaria de América y el Consejo Canadiense de los Animales los cuales consiste en métodos con agentes químicos como anestésicos inhalatorios, barbitúricos, así como métodos físicos, en México la Norma Oficial Mexicana NOM-ZOO-062 indica los métodos permitidos para realizar la muerte del animal los cuales se muestran en el cuadro 1 también indica cuales métodos no se consideran humanitarios por provocar dolor excesivo y estrés en el animal los cuales se muestran en el cuadro 2.<sup>(1, 6)</sup>

Los métodos de eutanasia causan la muerte por tres mecanismos básicos: los de depresión directa de la actividad neuronal necesaria para la función de la vida, la hipoxia y la interrupción física de la actividad cerebral. El proceso de eutanasia debe minimizar o eliminar el dolor, la ansiedad y la angustia antes de la pérdida de conciencia.<sup>(1, 7)</sup>



Cuadro 1 Métodos permitidos en la NOM- 062-ZOO-1999 Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

<b>Animales</b>	<b>Métodos Recomendados</b>	<b>Métodos Aceptados Condicionalmente</b>
Roedores y otros animales pequeños	Anestésicos inyectables barbitúricos , agentes inhalables, CO <sub>2</sub> , Ar, N <sub>2</sub> irradiación con microondas,	N <sub>2</sub> , Ar, dislocación cervical, decapitación

También indica cuales métodos no se consideran humanitarios por provocar dolor excesivo y estrés en el animal los cuales se muestran en la tabla 2 los cuales no suelen ser agradables ni éticos en todo el momento de realizarlos.<sup>(6, 7)</sup>

Cuadro 2 Métodos Prohibidos en la NOM- 062-ZOO-1999 Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio

<b>Agente</b>	<b>Comentario</b>
Descompresión	No es un método aceptado porque puede ocurrir la re compresión, muchas cámaras no son apropiadas, los animales inmaduros requieren prolongadas exposiciones y puede causar efectos desagradables en los observadores.
Congelamiento Instantáneo	No se considera humanitario cuando se usa como único método. Sólo se acepta en animales anestesiados.
Embolismo gaseoso	Sólo se permite en animales anestesiados ya que puede estar acompañado de convulsiones.
Ahogamiento	No se considera humanitario; no se acepta.
Estricnina	No se acepta porque causa convulsiones violentas y dolorosas contracciones musculares.
Agentes curariformes, Sulfato de Magnesio, Clorato de Potasio y Nicotina	No son aceptables porque no causan inconsciencia antes de la muerte, la cual ocurre por asfixia.

Cloroformo	No se acepta por el riesgo que implica para las personas, es hepatotóxico y probablemente cancerígeno.
Cianuro	No se acepta por el sumo peligro que representa, además la forma en que muere el animal causa un efecto desagradable en los observadores.
Contusión	Aun cuando puede causar inconsciencia en el animal, no se considera un método de eutanasia.
Éter	No se debe utilizar bajo ninguna circunstancia ya que es muy toxico para el operario y causan fuerte irritación en las vías respiratorias al ser inhalado.

### Métodos Físicos

Los métodos físicos pueden ser humanos dentro de los límites de peso apropiados, y cuando se realiza efectivamente por personas capacitadas y competentes. Sin embargo, los posibles problemas de bienestar y fuentes de sufrimiento cuando los ratones son sacrificados con la decapitación o dislocación cervical son los trastornos de captura y sujeción. Estos métodos destruyen la actividad cortical del cerebro, los signos de inconsciencia incluyen Colapso inmediato y un período de varios segundos de espasmo, seguido por movimientos lentos de las extremidades posteriores después de la aplicación del método; la posibilidad de error del operador; consecuencias de los errores del operador y el potencial para la recuperación después de la dislocación cervical incompleta, en algunos casos el método físico es utilizado de manera rápida para terminar con la vida, así mismo estos métodos deben estar supervisados por expertos en todo momento para no cometer un error y provocar dolor y angustia al animal.<sup>(7)</sup>

## Dislocación Cervical

La dislocación cervical se ha utilizado durante muchos años, para la eutanasia y cuando se realiza por personas bien individuadas en animales apropiados, parece ser humano.

El método ha sido utilizado para eutanasia de aves pequeñas, aves de corral, ratones y ratas (<200 g [7,1 oz]) y conejos.

Los animales deben estar inconscientes o anestesiados antes de la dislocación cervical; para ratas pesadas y conejos, la masa muscular grande en la región cervical hace la dislocación cervical físicamente más difícil cuando se realiza. El método consiste en colocar el dedo pulgar y el dedo índice a cada lado del cuello en la base del cráneo para ratones y ratas o, alternativamente, una varilla se presiona en la base del cráneo. Con la otra mano, se sujeta de la cola o las extremidades traseras y se tira rápidamente, causando la separación de las vértebras cervicales del cráneo.

Para los conejos inmaduros, la cabeza se sostiene en una mano y los miembros posteriores en el otro. <sup>(7-9)</sup>

Ventajas:

La dislocación cervical es un método que puede inducir una pérdida rápida de conciencia, no contamina químicamente los tejidos y es realizado rápidamente.

Desventajas:

La dislocación cervical puede ser desagradable al personal que está observando el método, la dislocación cervical requiere dominio de habilidades técnicas para asegurar que la pérdida de conciencia se induce rápidamente, su

uso para la eutanasia es limitado para aves pequeñas, aves de corral, ratones, ratas > 200 g y conejos.<sup>(7)</sup>

### Decapitación

La decapitación puede usarse en roedores y pequeños conejos en entornos de investigación. Su uso se justifica cuando se requiere recuperar tejidos y fluidos corporales no contaminados químicamente, también proporciona un medio para obtener tejido cerebral anatómicamente intacto para estudio.<sup>(5)</sup>

Aunque se ha demostrado que la actividad en el cerebro persiste durante 13 a 14 segundos después de la decapitación, estudios e informes más recientes indican que esta actividad no implica que se perciba el dolor, y de hecho concluyen que la pérdida de conciencia se desarrolla rápidamente. Potenciales evocados visualmente en ratones se redujeron más rápidamente después de la dislocación cervical en comparación con la decapitación, existen guillotinas diseñadas para lograr la decapitación de roedores adultos y conejos pequeños de forma uniforme e instantánea.

#### Ventajas:

La decapitación parece inducir pérdida rápida de la conciencia, no contamina químicamente los tejidos y se logra rápidamente.

#### Desventajas:

Manipulación y sujeción requerida para realizar la decapitación puede ser angustioso, la interpretación de la presencia de actividad eléctrica en el cerebro después de la decapitación, el personal que realice este método debe reconocer el peligro inherente de la guillotina y tomar precauciones para prevenir lesiones

personales y la decapitación puede ser estéticamente desagradable al personal que realiza u observa el método.<sup>(1, 7)</sup>

La decapitación es un poderoso estímulo de excitación y que la activación EEG resultante indica una percepción consciente del dolor y angustia el tiempo máximo que el dolor y la angustia podrían percibirse sería 2,7 segundos.<sup>(9)</sup>

### Irradiación con microondas

La irradiación por microondas por haz enfocado (FBMI) es un método relativamente nuevo para la eutanasia de pequeños mamíferos y está disponible para la mayoría de los investigadores.<sup>(10)</sup>

La irradiación es un método humano para la eutanasia pequeños roedores de laboratorio mediante microondas de haz focal, los instrumentos que se utilizan inducen pérdida de conciencia.

El calentamiento por irradiación de microondas por haz enfocado es utilizado principalmente por neurobiólogos para fijar los metabolitos cerebrales *In vivo* mientras se mantiene la integridad anatómica, los instrumentos difieren en el diseño de la cocina unidades y pueden variar en potencia máxima de 1,3 A 10 KW, toda esta energía se dirige por medio de microondas a la cabeza del animal.

La potencia necesaria para la actividad enzimática del cerebro depende de la eficiencia y la capacidad de afinar la cavidad resonante y el tamaño de la cabeza del roedor, hay una variación considerable entre los instrumentos en el tiempo requerido para la pérdida de la conciencia y la eutanasia. A 10 kW, 2,450 MHz, un Instrumento con una potencia de 9 kW aumenta la temperatura del cerebro en

ratones de 18 a 28 g hasta 79 ° C en 330 milisegundos y la temperatura del cerebro en ratas de 250- 420 g hasta 94 °C en 800 milisegundos.<sup>(7)</sup>

Ventajas:

Se pierde la conciencia en <100 milisegundos, y se provoca la muerte en <1 segundo, este es el método más eficaz para fijar el tejido cerebral in vivo para el ensayo posterior de productos químicos enzimáticamente lábiles.

Desventajas:

Los instrumentos son caros, Sólo los animales del tamaño de ratones y ratas pueden ser eutanasiados Con instrumentos comerciales que actualmente disponible.<sup>(7)</sup>

### Métodos Químicos

Son aquellos métodos en los que se utiliza un agente químico para efectuar el método de eutanasia en el animal, como agentes anestésicos inyectables y agentes volátiles inhalables.<sup>(11)</sup>

### Anestésicos Inyectables

Cuando se utilizan agentes anestésicos, el doble de la dosis anestésica produce parada respiratoria, mientras que cuatro veces esa dosis produce parada cardiaca cuando se utiliza ventilación asistida y tres veces la dosis, normalmente, produce la muerte rápida.

Son agentes químicos que se administran en el cuerpo mediante inyección intravenosa ya que entran directamente al sistema vascular lo que permite una rápida la llegada al cerebro o a centros neuronales, provocando rápida anestesia y

muerte, cuando se administran adecuadamente, los agentes de eutanasia inyectables producen una pérdida de conciencia lisa antes del cese de la función cardiaca y / o respiratoria, minimizando el dolor y la angustia del animal. <sup>(11, 12)</sup>

La administración vía intraperitoneal no causa mucho dolor cuando es administrada correctamente.

Los anestésicos inyectables suelen ser cloruro de potasio o sales de magnesio, alcoholes, barbitúricos, etc.<sup>(7)</sup>

### Barbitúricos

Los barbitúricos deprimen el Sistema Nervioso Central (SNC) en orden descendente, empezando por la corteza cerebral, con pérdida de conciencia progresando a la anestesia. Con una sobredosis, la anestesia profunda progresa a apnea debido a la depresión del centro respiratorio, y esto es seguido por un paro cardiaco. Todos los derivados de ácido barbitúrico utilizados para la anestesia son aceptables para la eutanasia cuando se administran IV, hay un inicio rápido de la acción y la pérdida de la conciencia inducida por los barbitúricos da lugar al dolor mínimo o transitorio asociado con venopunción.<sup>(13)</sup>

Los barbitúricos deseables son aquellos que son potentes, no irritantes, de acción prolongada, estables en solución y de bajo costo. El pentobarbital de sodio se ajusta mejor a estos criterios y es el más utilizado, aunque otros como el secobarbital también son aceptables.<sup>(7)</sup>

Se ha demostrado que una ruta adecuada de administración para los agentes barbitúricos es vía intraperitoneal (IP) cuando la inyección intravenosa no se

puede realizar o no es práctico, sin embargo es la punción de órganos vitales como el ciego que causa dolor y en algunas ocasiones peritonitis.<sup>(14-16)</sup>

Aun no se establece dosis específica de pentobarbital de sodio para la eutanasia, aunque se ha sugerido 200 mg / kg o 3 veces la dosis anestésica, si no se cuenta con personal capacitado dará lugar a varios inconvenientes potenciales asociados con la inyección IP, incluyendo mala inyección, la variabilidad en efecto y el dolor.<sup>(16)</sup>

Ventajas:

Una ventaja primaria de los barbitúricos es la velocidad de acción, este efecto depende de la dosis, la concentración, la ruta y la velocidad de la inyección, los barbitúricos inducen la eutanasia suavemente, con un mínimo malestar para el animal, los barbitúricos son menos costosos que muchos otros agentes de eutanasia.

Desventajas:

La inyección intravenosa es necesaria para obtener mejores resultados y esto requiere personal entrenado, cada animal debe ser adecuadamente restringido, algunos animales pueden pasar por una fase excitatoria que puede ser angustiante para los observadores, estos fármacos tienden a persistir en los restos del animal y pueden causar la sedación o incluso la muerte de los animales que consumen el cuerpo, pueden producirse artefactos de tejido (por ejemplo, esplenomegalia) en algunas especies eutanasiadas con barbitúricos.



## Agentes Volátiles Inhalables

La eutanasia usando agentes inhalados se considera que es un método estético adecuado para su uso con un gran número de animales simultáneamente, se ha propuesto que el animal se exponga a un gas anestésico volátil para la pérdida de la conciencia para minimizar la angustia.<sup>(17)</sup>

## Nitrógeno (N<sub>2</sub>) y Argón (Ar)

El nitrógeno y el argón son gases inodoros, incoloros e insípidos, siendo gases inertes, el nitrógeno comprende normalmente el 78% de aire atmosférico, mientras que argón comprende menos del 1%. Estos gases funcionan en el contexto actual desplazando el aire (O<sub>2</sub>), causando anoxia y condiciones de hipoxemia severas cuando hay concentraciones menores al 2% de oxígeno O<sub>2</sub> el argón produce la inconsciencia alrededor de 90 segundos y la muerte después de 3 minutos o 7 minutos usando N<sub>2</sub>.<sup>(7)</sup>

El argón y el nitrógeno no producen narcosis antes de la aparición de la hipoxia, que llevara a la inconsciencia seguida de la muerte que resulta de la parálisis del centro de la respiración cerebro anoxico.<sup>(13)</sup>

Ventajas:

El nitrógeno y argón no aparecen aversión directa a los pollos o pavos y la hipoxia resultante parece no ser aversiva o ligeramente aversivo a estas especies. Similarmente, N<sub>2</sub> y Ar las mezclas de gases no parecen ser directamente aversivas los cerdos y parecen reducir, pero no eliminar, el comportamiento respuestas a la hipoxia, el nitrógeno y argón son no inflamable, no explosivo y fácilmente disponible como gases comprimidos, los riesgos para el personal son

mínimos cuando se utiliza con equipos adecuadamente diseñados, argón y nitrógeno las mezclas de gases son más pesadas que el aire y puede estar contenido dentro de un aparato en el que los animales y las aves pueden bajarse o sumergirse.

Desventajas:

La hipoxia resultante de la exposición a estos gases es aversiva para ratas, ratones y visones, basándose en las funciones de lavado y lavado, los métodos de desplazamiento gradual utilizando N<sub>2</sub> o Ar, solos o mezclados con otros gases, pueden resultar en exposición a condiciones hipóxicas antes de la pérdida de conciencia. La pérdida de la conciencia será precedida por la respiración de boca abierta y la hiperpnea, que puede ser angustiante para las especies no vasculas, el restablecimiento de una baja concentración de O<sub>2</sub> (es decir, 6% o más) en la cámara antes de la muerte permitirá una recuperación inmediata, se requieren tiempos de exposición > 7 minutos para asegurar la muerte de los cerdos, al igual que con el CO<sub>2</sub>, las ratas eutanasiadas con Ar demuestran una hemorragia alveolar consistente con la asfixia terminal, el argón cuesta aproximadamente tres veces más que el N<sub>2</sub>, estos gases tienden a provocar un flujo más convulsivo en las aves que el CO<sub>2</sub> en las mezclas de aire.<sup>(7)</sup>

### Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>)

El dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) es el agente más comúnmente utilizado para la eutanasia de roedores de laboratorio, que se utiliza en una decenas estimado de millones de roedores de laboratorio por año en todo el mundo.<sup>(18)</sup>

Este método esta en concordancia con el bienestar animal y no presenta signos de angustia o dolor ya que produce una muerte rápida, es recomendado cuando es un desplazamiento gradual de 10% a 30% del volumen de la cámara del agente en referencia del oxígeno por minuto, ya que se ha demostrado que si hay un cambio gradual del 50% a 100% de reemplazo produce dolor y estrés al animal. (19, 20)

El dióxido de carbono es un compuesto de prueba de irritante comúnmente empleado en los estudios de quimioterapia nasal porque está esencialmente libre de propiedades de estímulo olfativo, el  $\text{CO}_2$  actúa vía hidratación a ácido carbónico  $\text{H}_2\text{CO}_3$  y disociación a  $\text{H}^+$  en el moco nasal, el cual presenta una activación resultante de sensores ácidos ya que tiende a disminuir el pH del líquido cefalorraquídeo, por consiguiente esta disminución de pH provocada por el  $\text{CO}_2$  indica que ejerce su efecto sobre los receptores de la disminución de N-metil-D-aspartato (NMDA), principalmente por la acidificación del líquido extracelular en lugar de una interacción directa con los receptores y la propia molécula del  $\text{CO}_2$ . A diferencia de los anestésicos inhalados el  $\text{CO}_2$  disminuye la concentración alveolar mínima (MAC) en comparación con los anestésicos utilizados, se ha demostrado que la concentración mínima es de 403 mmHg (aproximadamente 50% atm) en ratas, no teniendo cambios transitorios en el pH de la mucosa nasal durante la estimulación con  $\text{CO}_2$  en seres humanos.<sup>(21-23)</sup>

La inhalación de  $\text{CO}_2$  provoca acidosis respiratoria y produce un estado anestésico reversible disminuyendo rápidamente el pH intracelular, tanto la actividad neural basal como la evocada se deprimen poco después de la

inhalación de CO<sub>2</sub> al 100% La inhalación de CO<sub>2</sub> a una concentración del 7,5% 30% y más, causan anestesia profunda y muerte con exposición prolongada.(24)

Existen métodos para administrar CO<sub>2</sub> que incluyen colocar animales directamente en una cámara cerrada y precargada que contiene CO<sub>2</sub>, o exposición a una concentración gradualmente creciente de CO<sub>2</sub>.<sup>(7, 23)</sup>

Se ha reconocido que el CO<sub>2</sub> es un agente favorable porque induce una rápida pérdida de conciencia y una rápida muerte sin embargo en las recomendaciones de la AMVA se recomienda el uso de entre el 50 y 80% dentro de la cámara.

Se ha verificado que una cámara con una concentración de CO<sub>2</sub> menor al 50% y al 100% es ineficiente ya que produce aversión, estrés y sufrimiento, este agente a grandes concentraciones causa dolor y disnea una sensación de falta de aire y el aumento de esfuerzo respiratorio, es por esta razón que los umbrales de dolor para el CO<sub>2</sub> se encontraron en un promedio de 47%, la angustia relacionada con la disnea suele ocurrir entre el 7% y el 15% de CO<sub>2</sub>.<sup>(25, 26)</sup>

Este método es altamente recomendable ya que el efecto en los niveles de ciertas hormonas relacionadas con el estrés respuesta es mínimo, con sólo una ligera disminución en los niveles plasmáticos de corticosterona y la prolactina, en ratas.

Este método no solo se utiliza dentro de los laboratorios y solo con los animales de experimentación, al igual el CO<sub>2</sub> es altamente recomendable para la eutanasia de neonatos, aves e incluso de cerdos realizando el pre llenado de 15 al 30% en las cámaras de gas para no producir angustia ni gran sufrimiento al animal.<sup>(7, 27)</sup>

Ventajas:

Los efectos rápidos del depresor, analgésico y anestésico del CO<sub>2</sub> están bien establecidos, el dióxido de carbono está fácilmente disponible en cilindros de gas

comprimido, el dióxido de carbono es barato, no inflamable y no es explosivo y representa un riesgo mínimo para el personal cuando se utiliza con equipos adecuadamente diseñados, el dióxido de carbono no da lugar a la acumulación de residuos de tejidos tóxicos en los animales a partir de los cuales se producen alimentos.

Desventajas:

Existen diferencias sustanciales y conflictivas en respuesta a la inhalación de CO<sub>2</sub> entre y dentro de las especies, cepas y razas, lo que dificulta las generalizaciones, el dióxido de carbono, ya sea administrado por prefijos o por métodos de desplazamiento gradual, puede ser aversivo para algunas especies y, por lo tanto, existe el potencial de causar angustia, debido a que el CO<sub>2</sub> es más pesado que el aire, la acumulación de gas o el llenado incompleto de una cámara puede permitir que los animales suban o eleven sus cabezas por encima de las concentraciones efectivas de CO<sub>2</sub>, y eviten la exposición al gas, algunos individuos inmaduros y algunas especies acuáticas y madrigueras pueden tener tolerancia extraordinaria al CO<sub>2</sub>, los reptiles y anfibios pueden respirar demasiado lentamente para el uso de CO<sub>2</sub>, la eutanasia por exposición a CO<sub>2</sub> con suplementos de O<sub>2</sub> puede tomar más tiempo que la eutanasia por otros medios, la inducción de pérdida de conciencia en concentraciones < 80% puede producir lesiones post mortem de las vías respiratorias pulmonares y superiores y el CO<sub>2</sub> líquido son fuentes potenciales de angustia o lesión si se les permite entrar en contacto directo con los animales.<sup>(7)</sup>

## Combinación de Dióxido de carbono con otros agentes para inducir eutanasia

Actualmente, N<sub>2</sub>O se utiliza mezclándolo con O<sub>2</sub> y agentes anestésicos generales usados en anestesia humana para reducir el tiempo hasta la pérdida de la conciencia.

Se ha realizado la comparación de un método físico con la inducción de CO<sub>2</sub> en el cual se ha demostrado que hay un aumento de dopamina en los animales a los que se les aplica un método físico de eutanasia como es la dislocación cervical sin antes sedar al animal con una concentración de 1,7 ng por mg de proteína retiniana mientras que se ha verificado que en animales a los que se les aplica el método de CO<sub>2</sub> como eutanasia sus niveles son de 0.78 ng por mg de proteína retiniana, así mismo se identifica que el CO<sub>2</sub> al producir acidosis impide la recaptación de la dopamina al afectar la recepción en los transportadores, así la hipoxia asociada con la respiración de CO<sub>2</sub> concentrado podría inhibir la hidroxilación de tirosina y la biosíntesis de dopamina.<sup>(22)</sup>

Se ha comparado el efecto que tiene el isoflurano, con CO<sub>2</sub> donde se ha estimado que el tiempo de exposición para inducir una anestesia es alrededor de 10 minutos con isoflurano y con el CO<sub>2</sub> solo es de 1 minuto o menos al ser muy denso desplaza de forma rápida el oxígeno dentro de la cámara haciendo más efectivo el uso de este gas.<sup>(28)</sup>

## Animales de Laboratorio

Los roedores constituyen uno de los grupos de mamíferos más fecundos y numerosos de la tierra, debido a la extraordinaria capacidad de reproducirse que tienen sus poblaciones, unas de las características más importantes de algunas de

las especies de roedores son la adaptabilidad y la flexibilidad del comportamiento individual.

Estos animales tienen características generales, que los hacen muy adecuados para su uso en el laboratorio, como su pequeño tamaño, su alta proliferación, su facilidad de manejo y mantenimiento, etc. De hecho el ratón y la rata son las especies más usadas en el laboratorio

Los primeros estudios de comportamiento usando ratas se realizaron en una investigación de los efectos del alcohol, la dieta y los cambios barométricos sobre la actividad animal.<sup>(29)</sup>

Los ratones de laboratorio muestran una cantidad bastante limitada de polimorfismo genético. El ratón ha sido una de las principales especies de mamíferos utilizadas en estudios preclínicos que van desde la farmacología y la evaluación de la seguridad.<sup>(30)</sup>

Cuadro 3. Características de los diferentes animales usados en el laboratorio de evaluación de fármacos y medicamentos en FES Zaragoza

<b>Especies</b>	<b>Peso al nacer (g)</b>	<b>Edad destete</b>	<b>Peso al destete (g)</b>	<b>Edad pubertad(días)</b>	<b>Peso adulto (g)</b>
<b>Ratón</b>	1-2	19-21	10-12	35	25-30
<b>Rata</b>	5-6	21	35-40	45-75	250-400

## Rata

*Pertenecen al orden Rodentia y género Rattus y especie novergicus.* Entre las de mayor interés se encuentran:

- Sprague-Dawley: albina, cabeza fina y cola larga, sumamente prolífica y muy receptible a infecciones respiratorias.

- Wistar: albina, cabeza gruesa, cola más corta que el cuerpo, orejas largas y de sensible resistencia a ciertas infecciones. Sus camadas suelen ser reducidas.
- Long Evans: cuerpo blanco, cabeza, cuello y hombros negros.<sup>(31, 32)</sup>

Cuadro 4. Características generales de la rata

Especie	Ventajas	Fisiología y anatomía	Generalidades
<b><i>Rata (Rattus norvegicus)</i></b>	Es el más usado en fisiología, toxicología, farmacología, inmunología, su tamaño facilita técnicas de microcirugía	Hembra con ciclo estral de 4 a 5 días. El peso de un adulto es 250-500 gr son más longevas viven de 2 a 3 años	Son menos agresivos que los ratones; al igual que con éstos se debe controlar la temperatura, aire, humedad y bajos niveles de amoniaco; el agua y la comida se suministran ad-libitum

Se utilizan más para microcirugías, procesos de experimentación como: toxicología: ensayos de administración de dosis, embriotoxicidad, toxicidad neonatal, teratogénesis, mutagénesis, farmacología: evaluación de medicamentos y medicina comparada: modelos de enfermedades, microcirugía y geriatría.<sup>(31, 32)</sup>

## Ratón

Pertenece al orden Rodentia, genero *Mus* y especie *musculu*, es de tamaño pequeño, alta fecundidad, fácil manejo, bajo costo, variabilidad.<sup>(30)</sup>



Cuadro 5. Características generales del ratón

<b>Especie</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Fisiología y anatomía</b>	<b>Generalidades</b>
<b>Ratón (<i>Mus musculus</i>)</b>	Tamaño pequeño, alta fecundidad, fácil manejo, bajo costo, variabilidad, pesan entre 25-30 g	Hembras son poliéstricas, su ciclo estral es de 4 días con duración de 14 horas. Después del apareo se debe verificar tapón, las crías nacen de 19 a 21 días, tiene de 4-8 crías por camada	Viven en jerarquías, el material utilizado para cama debe estar libre de químicos, polvo y microorganismos; la comida se suministra ad libitum, en forma de pellets de 3-5g al día; el agua se administra ad libitum y se puede acidular o clorar

Se usan en procesos de experimentación como: toxicología, ensayos de administración de dosis, mutagénesis y neogénesis, en inmunología para la obtención de anticuerpos monoclonales, modelos de deficiencia, e histocompatibilidad y en oncología para medicina comparada en geriatría.

### Calificación

Es un proceso por el cual se hace un aseguramiento total para comprobar que un instrumento, equipo, área o sistema es apropiado para el uso destinado y que funcione adecuadamente dentro de las especificaciones establecidas por el usuario y el proveedor.

La calificación de equipos implica la prevención de problemas, seguridad, organización y la prevención de gastos por reparación así como asegurar la confiabilidad de las mediciones, proceso mediante una serie de verificaciones para asegurar que el equipo cumple con las especificaciones, además de asegurar de que todas las operaciones futuras serán de resultados confiables.

El estado calificado de un equipo o sistema se demuestra mediante la evidencia documentada en cada una de sus cuatro etapas: calificación de diseño, calificación de instalación, calificación de operación y calificación de desempeño.

### Calificación de Diseño

En esta calificación se describen las especificaciones de operación, funcionamiento del instrumento y se puntualizan las condiciones del proveedor, por lo que la calificación de diseño proporciona al usuario una oportunidad para demostrar que se ha considerado la capacidad del instrumento para ser incorporado dentro del proceso.

En esta etapa se evalúa principalmente el diseño en comparación con los requerimientos de Usuario.<sup>(33)</sup>

### Calificación de Instalación

En esta etapa se corrobora que las instalaciones, sistemas y/o equipos hayan sido instalados de acuerdo a los requerimientos de usuario y del fabricante. Establece que el instrumento se recibió como se diseñó y se especificó, que fue adecuadamente instalado en el ambiente seleccionado y que es apropiado para la operación y uso.<sup>(33)</sup>

### Calificación de Operación

En esta etapa se proporciona la evidencia de que las instalaciones, sistemas y equipos operan de acuerdo con las especificaciones funcionales requeridas, mediante la verificación documentada de que el equipo o instrumento involucrado

en el proceso opera como se definió en el diseño y determina valores óptimos de operación para cada una de sus variables o componentes.<sup>(33)</sup>

### Calificación de Desempeño

En esta etapa se incluyen las actividades que han sido desarrolladas para demostrar que la entidad se desempeña de acuerdo a los parámetros y especificaciones de determinado proceso, se demuestra la efectividad y la reproducibilidad del proceso mediante pruebas del sistema en condiciones normales de operación.

Se verifican los rangos de funcionamiento óptimo deben estar descritos en los manuales de los equipos.<sup>(33)</sup>

## Planteamiento del problema y Justificación

En la actualidad el uso de animales de experimentación dentro de la investigación seguirá siendo de vital importancia, para evitar el sufrimiento de las personas gracias al avance de la ciencia, es así que se debe crear la conciencia de carácter ético es por eso que la eutanasia se considera un procedimiento humanitario empleado para terminar con la vida de los animales de laboratorio, sin producirles dolor, angustia o sufrimiento, en cualquier laboratorio debe contar con equipo y un método adecuado y permitido dentro de la normatividad vigente para el sacrificio de los animales (Eutanasia) para cumplir.

Se analiza el diseño de un método adecuado y permitido para el Laboratorio de Evaluación de Fármacos y Medicamentos ya que actualmente no se cuenta con el equipo y método indicado, para el sacrificio de los animales (ratas y ratones) que se utilizan para las prácticas dentro del laboratorios creando un bajo interés por conocer el tema, esto conlleva un mayor tiempo empleado para el sacrificio del animal y utilizar un método que no está aprobado, además causa desagrado al llevar a cabo la dislocación cervical debido a que el alumno es quien debe realizarla, así mismo el uso del equipo traerá gran ventaja en el método de sacrificar a los animales utilizados ya que además en su interior se podrá contener hasta 5 ratas y 12 ratones, con un tiempo de exposición corto y evitando provocarle sufrimiento y estrés al animal.

## Hipótesis

Mediante el uso de la NOM-062-ZOO-1999 se adecuará un método permitido (cámara de CO<sub>2</sub>) para el sacrificio correcto de los animales que son utilizados en las prácticas dentro del Laboratorio de Evaluación de Fármacos y Medicamentos I y II, que permitirá estar dentro del marco jurídico de nuestro país así como dar a conocer a los alumnos el manejo de la cámara de CO<sub>2</sub>.

## Objetivos

### Objetivo General

- Diseñar, construir e implementar una cámara que utiliza Dióxido de Carbono como agente inhalable método permitido en la NOM-062-ZOO-1999 para el sacrificio correcto de Ratas y Ratones, en el laboratorio de Evaluación de Fármacos y Medicamentos.

### Objetivos específicos

- Realizar la Calificación del equipo conforme a lo que indica la NOM-059-SSA1-2015, para establecer y asegurar el correcto funcionamiento del mismo.
- Elaborar un Procedimiento Normalizado de Operación, que contendrá las instrucciones de uso adecuadas.

## Diseño Experimental

### *Tipo de estudio:*

- Descriptivo

### *Población de estudio:*

1. Ratas Wistar de 200 a 400 g de peso que este dentro de los controles de eutanasia para control de población.
2. Ratones de 30 a 65 g de peso que sean considerados sacrificar para controla la población.
3. Ratas y Ratones que han sido utilizados para una práctica experimental donde se tenga que sacrificar.

### *Criterios de inclusión:*

1. Ratas y ratones que han sido utilizados para una práctica experimenta y se tengan que sacrificar.
2. Ratas y ratones procedentes del bioterio para prácticas experimentales dentro del Laboratorio de Evaluación de Fármacos y Medicamentos.

### *Criterios de exclusión:*

1. Animales de experimentación que sean diferentes a ratas y ratones.
2. Prácticas que no involucren animales de experimentación.

### *Variables:*

- V. dependiente: la cantidad de prácticas realizadas y la cantidad de CO<sub>2</sub> utilizada para el sacrificio del animal.
- V. independiente: el tipo de animal de experimentación.<sup>(34)</sup>

## Material

- Cámara de acrílico negro
- Tanque de CO<sub>2</sub>
- Válvula de seguridad (Regulador de Flujo) y manómetro de presión diferencial
- Ratas y Ratones (animales de Experimentación)

## Método

Instalar la cámara dentro del laboratorio de evaluación de fármacos y medicamentos, conectando al tanque que será proporcionado dentro de la institución.

### Calificación del equipo (Cámara de CO<sub>2</sub>)

Se realizó las 4 etapas de calificación durante la calificación de diseño, se realiza la investigación bibliográfica y se revisa el plano de diseño, así como el proveedor del tanque de CO<sub>2</sub>.

Se verifica la etapa de calificación de instalación se realiza la verificación de los componentes principales del equipo, se verifica el área donde se ubica el equipo.

Se verifica la etapa de calificación de operación donde se considera realizar pruebas de operación como velocidad de flujo, regulación de presión, abertura de puertas, tiempo de llenado de cámara y tiempo en el que se libera el CO<sub>2</sub> de la cámara.

Se realiza la etapa de Calificación de desempeño donde se ha establecido el método a utilizar, en el cual se observa que los parámetros dados de la etapa de operación se conservan constantes y se obtiene un buen uso de este.



Realizar el plano de diseño de la cámara de gas bajo las medidas permitidas, en las áreas que albergan animales de experimentación (se anexa diseño de la cámara al protocolo).

Construir una cámara de gas con tapa desmontable y teniendo la tubería en la parte de arriba para conectar el tanque de CO<sub>2</sub>.

Calificar el diseño de la cámara mediante las siguientes especificaciones: Especificaciones de Usuario, plano de diseño de la cámara especificando las medidas correctas, debe contener especificación de las tuberías y accesorios y ubicación, debe contener un las dimensiones y la ubicación dentro del área a instalar.

Se realiza el instructivo de uso para verificar el correcto funcionamiento del equipo.

Diagrama de flujo 1

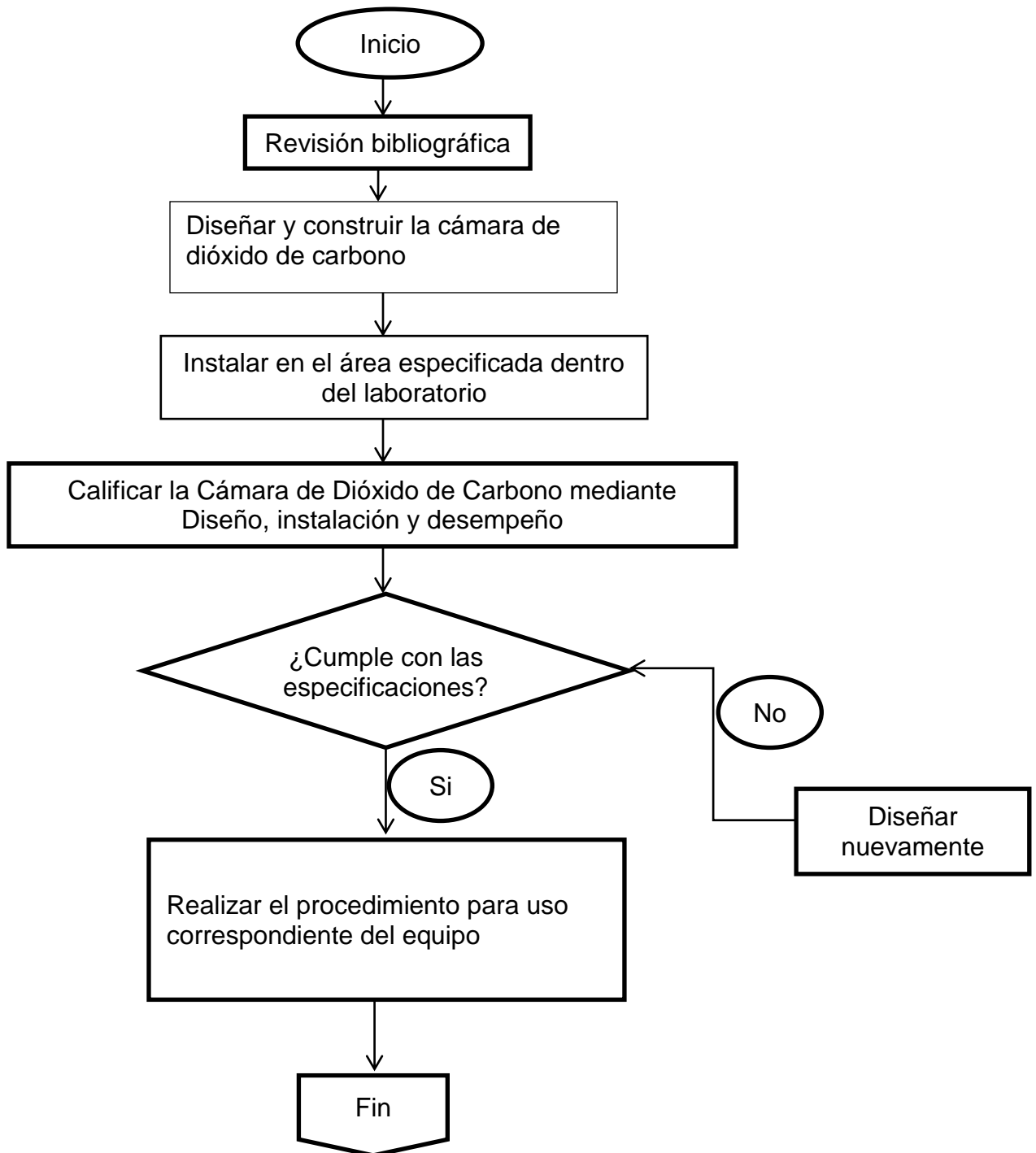
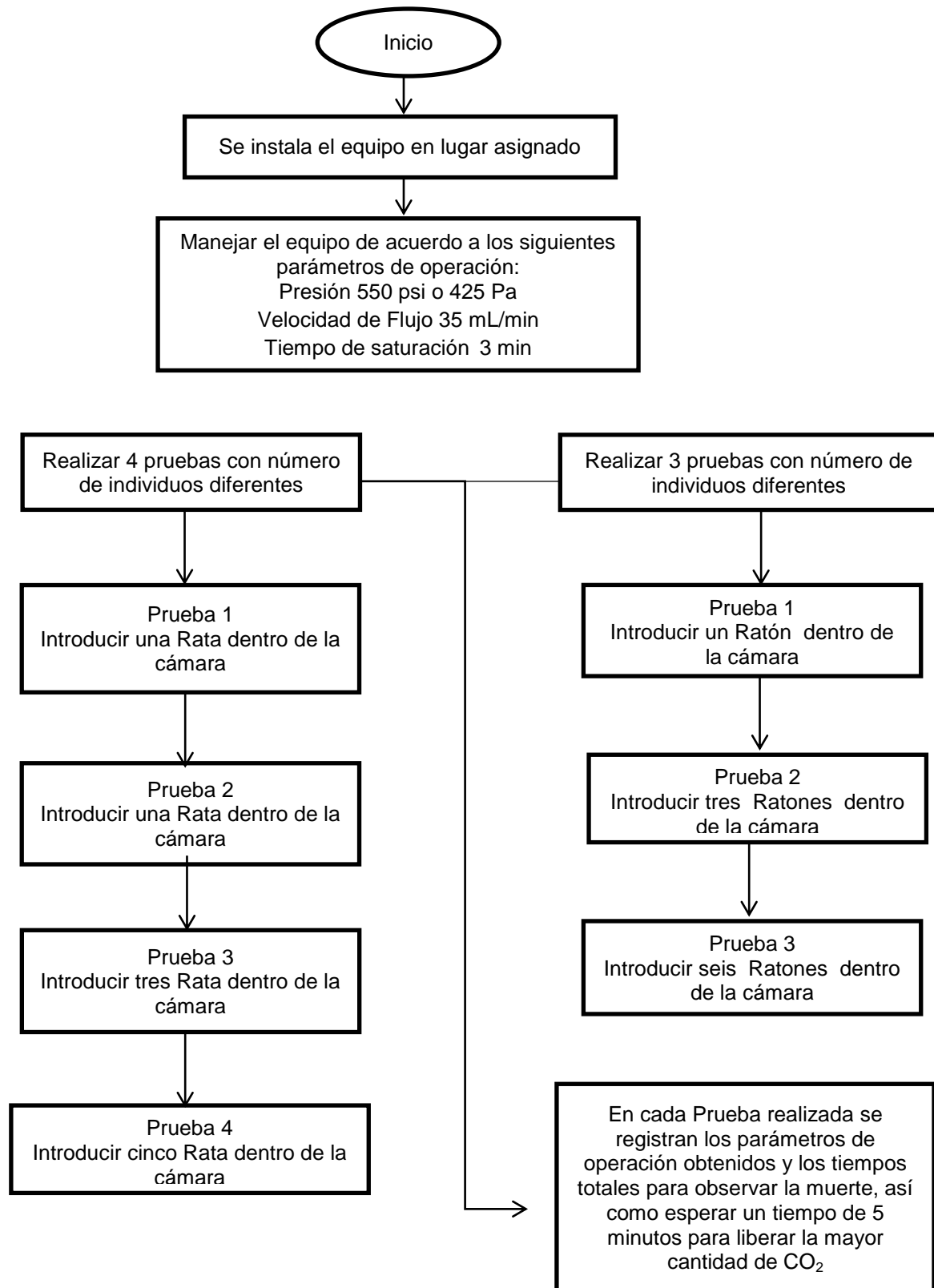


Diagrama de flujo 2



## Resultados

### Calificación de Diseño

Se cuenta con la Información documental adecuada, verificando que cuenta con Procedimiento Normalizado de Operación para el uso y limpieza del equipo, Ficha técnica del Equipo, Plano de diseño delimitando dimensiones.

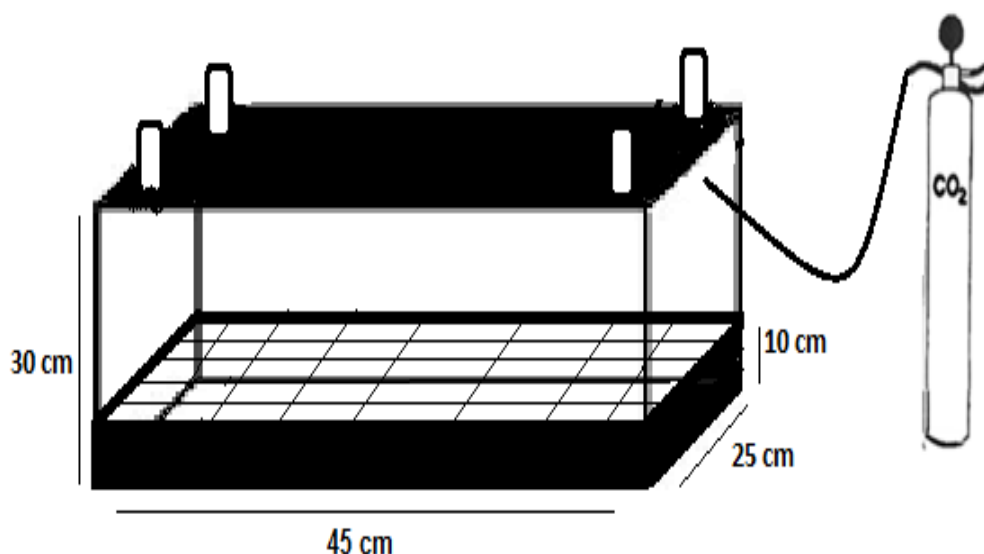


Imagen 1. Diseño de la Cámara de Dióxido de Carbono

Las dimensiones especifican una cámara diseñada para 5 ratas y para 12 ratones, se puede observar en las imágenes 2 y 3

Se cuenta con el plano de diseño adecuado para su construcción con las dimensiones requeridas por el usuario final, con una delimitación de área adecuada para su instalación y operación, el diseño permite la fácil manipulación y limpieza del equipo.

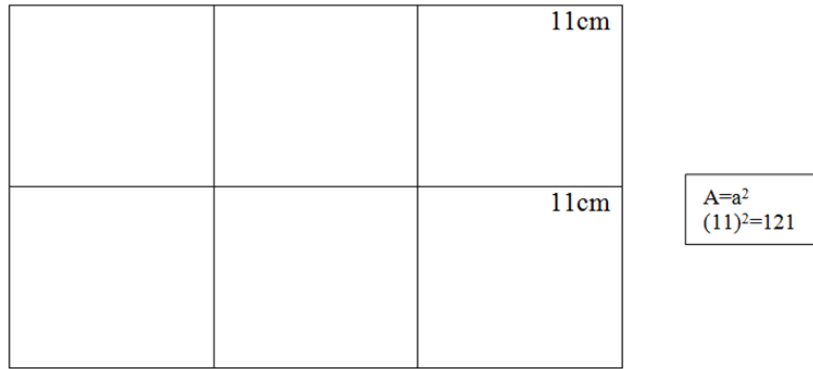


Imagen 2 área que ocupa cada rata con libre flujo de movimiento

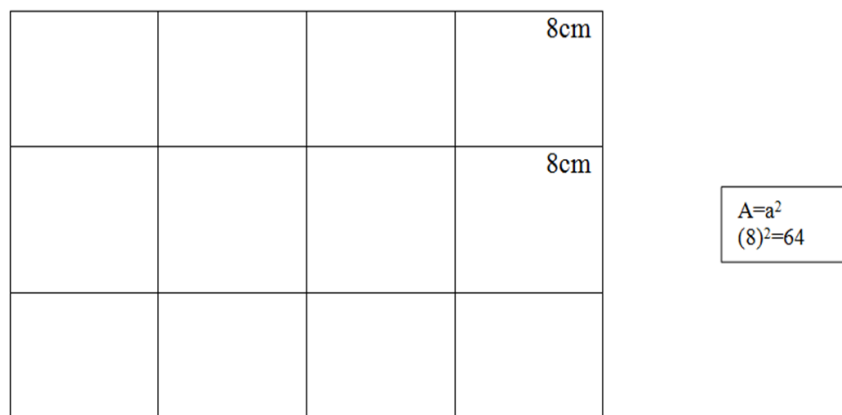


Imagen 3 área que ocupa cada ratón con libre flujo de movimiento

**Nota: para obtener las medidas anteriores se consideró la superficie de cada rata y ratón**

### Calificación de Instalación

Se realizó la verificación de dimensiones de equipo y áreas destinada para la ubicación, obteniendo las siguientes medidas:

Cuadro 6. Dimensiones del equipo

Dimensiones	Cámara de CO <sub>2</sub> (cm)	Campana de extracción (cm)	Tanque de CO <sub>2</sub> (cm)
Alto	30	90	160
Ancho	25	70	50
Largo	45	120	60

En las siguientes imágenes se aprecia la instalación del equipo y sus diferentes componentes:



Imagen 4. Cámara de CO<sub>2</sub> en campana de extracción



Imagen 5. Área destinada para el sistema de eutanasia



Imagen 6. Reja de protección del tanque

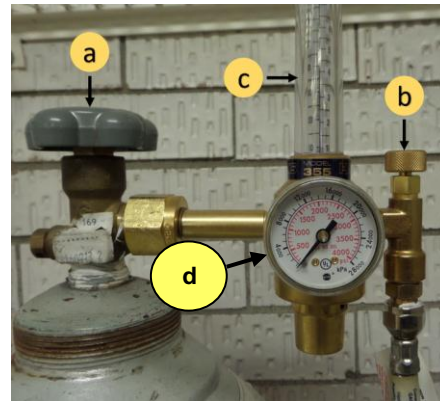


Imagen 7. Instrumentos del sistema de la cámara de CO<sub>2</sub>  
a) Perilla de apertura del tanque  
b) Regulador de flujo  
c) Visualizador de nivel de flujo  
d) Manómetro de presión diferencial

La cámara de gas y el tanque de CO<sub>2</sub> están conectados mediante una manguera de 5 cm, como se aprecia en la imagen siguiente.



Imagen 8. Manguera de conexión

### Calificación de Operación

Se realizó el uso de los instrumentos principales

- Perilla del tanque de CO<sub>2</sub>
- Regulador de Flujo
- Visualizador de la velocidad de flujo y manómetro de presión diferencial

Se Obtuvieron los siguientes parámetros de operación del equipo:

Cuadro 7. Condiciones de operación

Presión (psi o Pa)	550 psi o 425 Pa
Velocidad de Flujo (mL/min)	35 mL/min
Tiempo de saturación de CO <sub>2</sub> (min)	3 min

El equipo opera de manera eficiente, ninguno de sus instrumentos y componentes presenta alguna falla durante el uso rutinario

Se verifico que el equipo no presenta fugas, ni un mal funcionamiento siendo evaluados estos parámetros de operación. Cumple con esta etapa.

El equipo presenta una velocidad máxima de flujo, siendo de 60 mL/min obteniendo un poco de cristales de CO<sub>2</sub> por la baja temperatura y presión de uso.

## Calificación de Desempeño

Se evaluó el desempeño del equipo mediante el método de eutanasia por medio de CO<sub>2</sub>.

Utilizando los parámetros verificados en la etapa de calificación de operación, que se mencionan en el cuadro 7.

La cámara puede albergar hasta 5 ratas y 12 ratones ya que cuenta con una superficie cubierta por animal:

Cuadro 8. Superficie recomendada por animal

Animal	Superficie cm <sup>2</sup>
Ratas (grupos menores a 100 ratas)	109.6
Ratones (grupos menores a 60 ratas)	64.5

Los tiempos indicados para provocar la muerte del animal se mencionan en el cuadro siguiente, considerando el tiempo que tarda la cámara en saturarse de gas.

Cuadro 9. Tiempo señalado para la muerte con saturación de gas

Animal	Tiempo (min)
Rata	10
Ratón	5

## Método de Eutanasia por medio de Cámara de CO<sub>2</sub>

Bajo las condiciones de operación verificadas en la etapa de calificación que mencionan en el cuadro 7, se realizaron pruebas con los animales de estudio de la siguiente manera.

Con la cámara saturada de gas se introdujeron los animales de estudio de la siguiente manera:



Cuadro 10. Pruebas con ratas.

Prueba	Condiciones de Operación	Número de Individuos (Rata)	Tiempo restante para la muerte (min)
1	Presión 550 psi o 425 Pa Velocidad de Flujo 35 mL/min Tiempo de saturación 3 min	1	7.15
2		1	7.10
3		3	7.05
4		5	7.00
Promedio de Tiempo			7.04

Cuadro 11. Pruebas con ratones.

Prueba	Condiciones de Operación	Número de Individuos (Ratón)	Tiempo restante para la muerte (min)
1	Presión 550 psi o 425 Pa Velocidad de Flujo 35 mL/min Tiempo de saturación 3 min	1	2.10
2		3	2.08
3		6	2.12
Promedio de Tiempo			2.10

Se observó que se necesita un intervalo de tiempo de exposición en la cámara previamente saturada con dióxido de carbono, para provocar la muerte de los animales de estudio, los cuales se mencionan en el cuadro siguiente:<sup>(7, 11)</sup>

Cuadro 12. Tiempo de muerte en los animales experimentales.

Animal	Tiempo para provocar la muerte (min)
Rata	7 min posteriores al tiempo de saturación de la cámara
Ratones	2 min posteriores al tiempo de saturación de la cámara

En las siguientes imágenes se observa que a los individuos presentan heces fecales, debido a que se relaja el esfínter, siendo un indicativo de la muerte del animal.

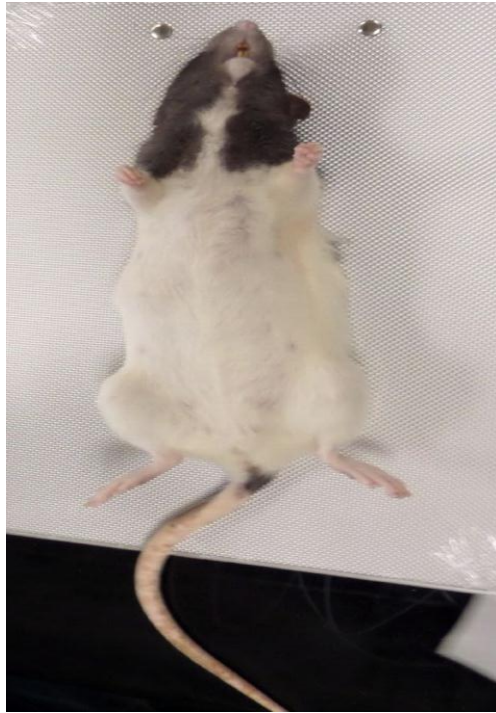


Imagen 13. Rata con tratamiento en cámara



Imagen 14. Ratón con tratamiento en cámara

Se realizó la confirmación de la muerte mediante la técnica de dislocación cervical, los animales se colocaron en un contenedor adecuado para su disposición final por parte del bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.



Imagen 15. Dislocación de rata

### Análisis de Resultados

El estudio de calificación fue realizado, debido a que es un requerimiento normativo; este estudio comprende de 4 etapas (diseño, instalación, operación y desempeño), se consideró el área destinada para el equipo, el espacio adecuado para la maniobra y la liberación del CO<sub>2</sub>.

### Etapas de Diseño

Se consideró el espacio asignado para ubicar la cámara de CO<sub>2</sub>, colocando la en la campana de flujo laminar, teniendo las medidas siguientes: alto 30 cm, largo 45 cm, ancho de 25 cm, así mismo fue considerado una charola para los desechos del animal con unas medidas de alto 10 cm, largo 40 cm y ancho 20, así como una reja provista en su interior con dimensiones de largo 44 cm y ancho 24 cm, con un área de 121 cm, siendo para cada rata una superficie de 11 cm<sup>2</sup>, y siendo para cada ratón una superficie de 8 cm<sup>2</sup>, se consideran las medidas adecuadas ya que lo animales necesitan tener libre movimiento durante el tiempo que se encuentren dentro de la cámara, ya que con un espacio limitado el animal tiende a estresarse

y ser más doloroso el procedimiento para este así como llevar más tiempo del adecuado para su muerte.

### Etapa de Instalación

Se pudo comprobar que los aditamentos fueran los necesarios, que el regulador de flujo contenga un manómetro de presión diferencial para regular la velocidad de flujo liberada hacia la cámara haciendo casi imperceptible el ruido de la salida del gas al tanque ayudando a que los animales no se estresen durante su uso, así como comprobar que la manguera fuera la adecuada para el gas utilizado, con las uniones correctas y en perfectas condiciones, que la colocación del tanque este a una distancia adecuada y resguardado para evitar su daño. Siendo esta etapa solo la inspección visual de las partes que componen todo el sistema (cámara de acrílico reforzado, manguera de gas, regulador de flujo, manómetro de presión diferencial calibrado, tanque de CO<sub>2</sub>, lugar de resguardo), la forma adecuada de montar y desmontar el equipo para su resguardo adecuado.

### Etapa de Operación

Se comprueba que las partes que componen todo el sistema funcionen adecuadamente, es una inspección del sistema que comprende el tanque en este se considera que la perilla para apertura y cierre de gas no presente algún daño que dificulte su maniobra, el regulador de flujo acompañado del manómetro de presión diferencial funcionen adecuadamente que la marca de mercurio valla midiendo el flujo conforme aumenta y disminuye el flujo de gas, el manómetro de presión diferencial marca correctamente la presión cuando hay el aumento o

disminución del flujo, la manguera que se utiliza como conexión no presenta fugas, no se encuentra rota y embona correctamente en los lugares destinados para su colocación, que el equipo (Cámara de CO<sub>2</sub>) no contenga alguna abolladura, rotura, esto es debido que durante la operación lo que se verifica es la capacidad máxima de flujo de gas por minuto, medido en mL/min (60 mL/min), la operación del equipo es la correcta ya que mostro que no hay alguna fuga permisible por donde el gas se escape, que la cámara sella perfectamente siendo una correcta operación.

### Etapa de Desempeño

Se comprobó que el equipo cumple con las funciones con las que fue diseñado y construido, en esta etapa se verifico que el tiempo de flujo necesario para suministrar el gas es de 3 minutos, a una velocidad de 35 mL/min y con una presión de 550 Psi o 425 Pa, estas son las condiciones necesarias para saturar la cámara por completo. La cantidad de individuos en la cámara es 5 ratas y la 12 ratones, el libre movimiento del animal es el adecuado para su manipulación, esto se realizó durante la primera prueba con una rata, siendo el número menor que contiene la cámara, para establecer que las condiciones son adecuadas, la segunda prueba se realizó con tres ratas , las condiciones fueron adecuadas sin cambiar el desempeño ya que se adormecen sin dificultad, la última prueba se realizó con cinco ratas, que se considera la capacidad máxima que puede albergar la cámara sin modificar los parámetros para el buen funcionamiento del equipo.

Para la prueba de desempeño en ratones se utilizó las condiciones de operación de 3 minutos a una velocidad de flujo de 35 ml/min y con una presión de 550 Psi o

425 Pa, estas son las adecuadas ya que presenta el efecto de saturación en la cámara con gas y posteriormente se expusieron los ratones dentro de la cámara durante dos minutos de exposición para observar que el animal ha muerto.

El equipo se considera calificado y cumple con las funciones para lo que fue diseñado y construido.

### Método de Eutanasia

El método de eutanasia trabajado provoca una rápida sedación, no se observan señales de angustia en los animales sacrificados, es el método recomendado para la docencia ya que es rápido e indoloro para el animal que se va a sacrificar; el proceso es un adormecimiento del Sistema Nervioso Central, el cual se relaja provocando anestesia y causando un paro respiratorio debido a la acumulación de CO<sub>2</sub> y la liberación de oxígeno.

El gas es más pesado que el oxígeno desplazándolo del interior de la cámara hacia fuera, tomando un tiempo de 3 minutos para saturar el entorno de la cámara de gas, siendo casi imperceptible para los animales, después de liberarse el oxígeno al ambiente el CO<sub>2</sub> ocupa el ese espacio dentro de la cámara, causando efectos de analgesia que relaja al individuo, bajando la frecuencia de la respiración y las pulsaciones cardíacas, provocando que los animales caigan en un sueño profundo. <sup>(35-39)</sup>

Este método como es el más utilizado presenta las ventajas que se es un método recomendado y se encuentra validado los tiempos de exposición al gas, siendo igual concentraciones conocidas en un balance de 70% y 30% de dióxido de

carbono y oxígeno que se encuentren en el interior de la cámara para provocar analgesia y posterior la muerte. <sup>(39)</sup>

Los tiempos establecidos son adecuados para observar que el animal a muerto esto es para evitar que solo se encuentren sedados y posterior a unos minutos puedan recuperar su movilidad, teniendo un tiempo de exposición de 7 minutos posteriores a interrumpir el flujo de gas dentro de la cámara para ratas, y una exposición de 2 minutos más después del cese de flujo de gas para ratones, es el tiempo acumulado de 10 minutos totales para ratas y 5 minutos totales para ratones, haciendo efectivo el método para provocar la muerte, las condiciones de trabajo son: velocidad de flujo 35 mL/min y con una presión de 550 psi o 425 Pa son adecuadas para considerar que el método es reproducible y que bajo estas condiciones siempre provocara la muerte del animal. <sup>(35)</sup>

Siendo adecuado el uso de la extracción con la campana de flujo laminar durante 5 minutos para extraer el CO<sub>2</sub>, esto es al finalizar el uso para que al limpiar la cámara no haya algún peligro de exposición a quien este maniobrando los equipos así mismos para que tenga el correcto resguardo y no haya acumulación de gas.

Conclusiones. <sup>(40, 41)</sup>

El equipo cumple con los resultados en cada etapa de calificación y se establece un método adecuado para la muerte de los animales utilizados durante las prácticas de experimentación del Laboratorio de Evaluación de Fármacos y Medicamentos, siendo de apoyo didáctico y docente para establecer una forma más adecuada de ejercer la muerte y disposición final del animal de experimentación.

Es uno de los métodos más utilizados, aunque se ha considerado que causa angustia, algunos artículos han demostrado que si causa dolor y sufrimiento, esto debido a que cuando las concentraciones de CO<sub>2</sub> son mayores a las recomendadas, pero mientras se utilice en cantidades adecuadas es un método legal y permitido en la Norma Oficial Zootécnica 062 de 1999.

### Perspectivas

Se aporta seguridad y concientizando a la comunidad estudiantil de los laboratorios de Evaluación de Fármacos y Medicamentos de tratar con dignidad y respeto al animal a sacrificar, se espera que la vida del equipo mediante el cambio de tanque y mantenimiento de los componentes principales sea larga.



## Ficha Técnica para el Uso del Equipo de Eutanasia

Para el cumplimiento de la normatividad vigente respecto al uso de Animales de Laboratorio

Característica	Observaciones
<b>Capacidad</b>	<p>La capacidad máxima está determinada de acuerdo a las dimensiones de la cámara.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Ratas:</b> 5</li> <li>• <b>Ratones:</b> 12</li> </ul>
<b>Flujo de CO<sub>2</sub></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antes de hacer pasar el CO<sub>2</sub> a la cámara, colocar el número de roedores <b>sin sobrepasar la capacidad máxima.</b></li> <li>• El <b>indicador de flujo</b> debe llegar a la <b>marca de 35.</b></li> </ul>
<b>Tiempo de Flujo (TF)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El tiempo inicia <b>a partir</b> de que la esfera se localiza en la marca de 35.</li> <li>• El tiempo de flujo (TF) debe ser de <b>3 minutos</b> sin importar si es rata o ratón.</li> <li>• Transcurrido el tiempo cerrar la llave de paso y el regulador)</li> </ul>
<b>Tiempo de exposición</b>	<p>Se entiende como tiempo de exposición al tiempo en el que la especie animal se encuentra en contacto directo con el CO<sub>2</sub>.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Ratas:</b> 10 minutos (TF + 7 minutos)</li> <li>• <b>Ratones:</b> 5 minutos (TF + 2 minutos)</li> </ul>
<b>Confirmación de la muerte</b>	<p>Una vez concluido el tiempo de exposición, asegurar que no exista actividad cardíaca (palpar sobre el pecho) y <b>asegurar la muerte por dislocación</b></p>

La disposición de los cadáveres debe realizarse de acuerdo a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo

# Ficha Técnica para el Uso del Equipo de Eutanasia

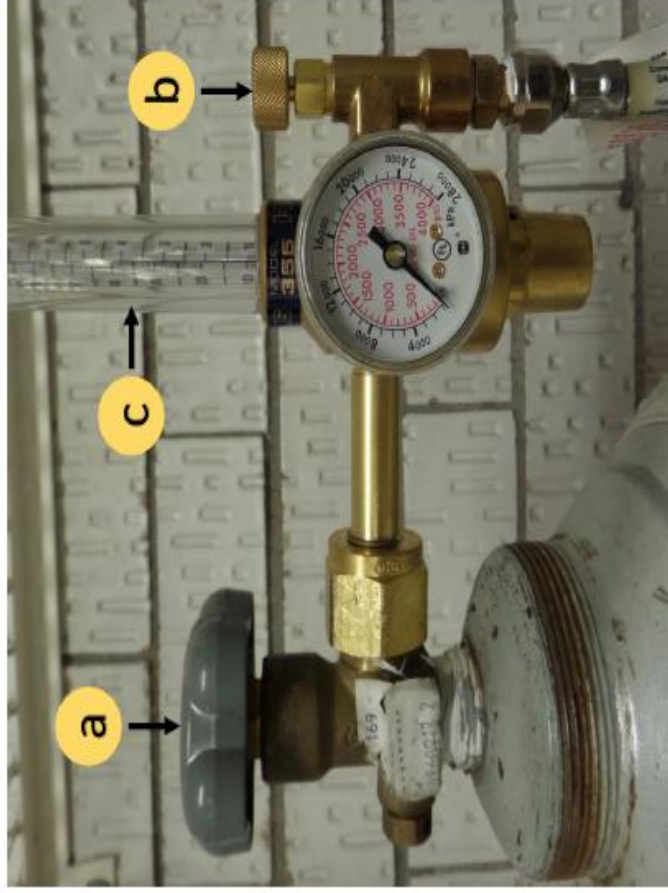
## Elementos del Regulador de Flujo Harris Modelo 355

### Regulador de flujo


- a) Llave de paso
- b) Válvula para el control de flujo
- c) Indicador de flujo

### Pasos para ajustar el flujo

Para enviar el CO<sub>2</sub> a la cámara, giramos la llave de paso del tanque (a), posteriormente giramos la válvula para el control de flujo (b) hasta ver en el indicador de flujo (c) que la esfera metálica se mantiene en 35 (d). Para cerrar el flujo giramos la llave de paso (a) y la válvula (b) en sentido contrario.



## Procedimiento Normalizado de Operación

	Procedimiento Normalizado de Operación Uso de la Cámara de Dióxido de Carbono (CO <sub>2</sub> )		Código / Revisión: PNO-EVA-00
			Página 1 de 5
			Departamento emisor: Evaluación de Fármacos y Medicamentos
Emisión:01/FEB/17		Vigencia:01/FEB/17	Próxima revisión: FEB/19
Elaboró:			Autoriza:
Q.F.B Rocío de los Santos Hernández		Q.F.B Luis Arturo Toquero Elizalde	Q.F.B Enrique Escalera Zúñiga
Fecha		Fecha	Fecha

### 1. OBJETIVO

1.1. Establecer los lineamientos necesarios para el correcto uso de la cámara de CO<sub>2</sub>.

### 2. ALCANCE

2.1. Este procedimiento aplica al uso de la cámara de CO<sub>2</sub> en el laboratorio de evaluación de fármacos y medicamentos, de la Facultad de estudios superiores Zaragoza en la Carrera de Química Farmacéutico Biológica.

### 3. DEFINICIONES Y ABREVIATURA

3.1. **Calificación:** A la evaluación de las características de los elementos del proceso.


3.2. **Eutanasia:** Muerte sin dolor y sin sufrimiento.

### 4. RESPONSABILIDADES

#### 4.1. Alumno:

4.1.1. Revisar el Procedimiento para comprender el uso de la cámara de CO<sub>2</sub>.

4.1.2. Registrarse en la bitácora de uso de equipo, con el fin de mantener un registro de los usuarios.

	Procedimiento Normalizado de Operación Uso de la Cámara de Dióxido de Carbono (CO <sub>2</sub> )	Código / Revisión: PNO-EVA-00
		Página 1 de 5
		Departamento emisor: Evaluación de Fármacos y Medicamentos

## 4.2. Profesor de Evaluación de Fármacos y Medicamentos

- 4.2.1. Revisar el presente procedimiento con el fin de capacitar a los nuevos usuarios cada que se requiera.
- 4.2.2. Revisar la bitácora de registro con el fin de verificar que se mantengan los registros al día.
- 4.2.3. Mantener el tiempo establecido de flujo del gas para mantener el uso adecuado de los insumos.
- 4.2.4. Mantener siempre el tanque de CO<sub>2</sub> disponible para el uso.
- 4.2.5. Revisar y aprobar el presente procedimiento con el fin de garantizar el buen uso del equipo así como de las partes que componen el sistema.


## 5. FRECUENCIA

5.1. Cada que se realice una práctica que conlleve el uso de animales de experimentación (rata o ratón) dentro del Laboratorio de Evaluación de Fármacos y Medicamentos de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por parte de la carrera de Química Farmacéutico Biológica.

## 6. DESARROLLO

### 6.1. Lineamientos Generales:

- 6.1.1. saque la cámara del lugar de resguardo y verifique que los aditamentos se encuentren en buen estado (manguera, conexión, manómetro de presión diferencial, regulador de flujo, perilla de tanque de gas, tapa de la cámara, recipiente colector de desechos del animal).
- 6.1.2. Monte la cámara con las conexiones del tanque al equipo y verifique que se hayan colocado correctamente.

	Procedimiento Normalizado de Operación Uso de la Cámara de Dióxido de Carbono (CO <sub>2</sub> )	Código / Revisión: PNO-EVA-00
		Página 1 de 5
		Departamento emisor: Evaluación de Fármacos y Medicamentos

**6.1.3.** Utilice al finalizar la práctica requerida la cámara de gas como método para provocar la muerte del animal.

**6.1.4.** Coloque en el interior un máximo de 5 ratas o un máximo de 12 ratones.

**6.1.5.** Cierre la tapa del equipo, habrá el flujo del tanque de gas y verifique que se encuentre a un flujo de 35mL/min y una presión de 45 bares.

**6.1.6.** Permita el flujo a la cámara durante 3 minutos, posterior a este tiempo cierre la llave del tanque para cesar el flujo de gas al interior de la cámara.

**6.1.7.** Permita un tiempo de 2 minutos más después del cese de la entrada de gas para provocar la muerte del ratón.

**6.1.8.** Permita un tiempo de 7 minutos más después del cese de la entrada de gas para provocar la muerte de la Rata.

**6.1.9.** Habrá la Tapa del equipo y verifique al termino de los tiempos establecidos de exposición para cada especie de animal los siguientes aspectos.


- Ojos opacos
- Que ya no respire el animal
- Que en su corazón ya no se sientan leves palpitaciones

**6.1.10.** Verifique la muerte del animal con el método de dislocación cervical colocando los dedos detrás de la cabeza y jalando por la base de la cola hasta tronar las cervicales.

**6.1.11.** Al término de la práctica y de sacrificar la cantidad total de animales, encienda la campana de flujo laminar por un tiempo de 5 minutos para que el interior de la cámara de gas esté libre de CO<sub>2</sub>.

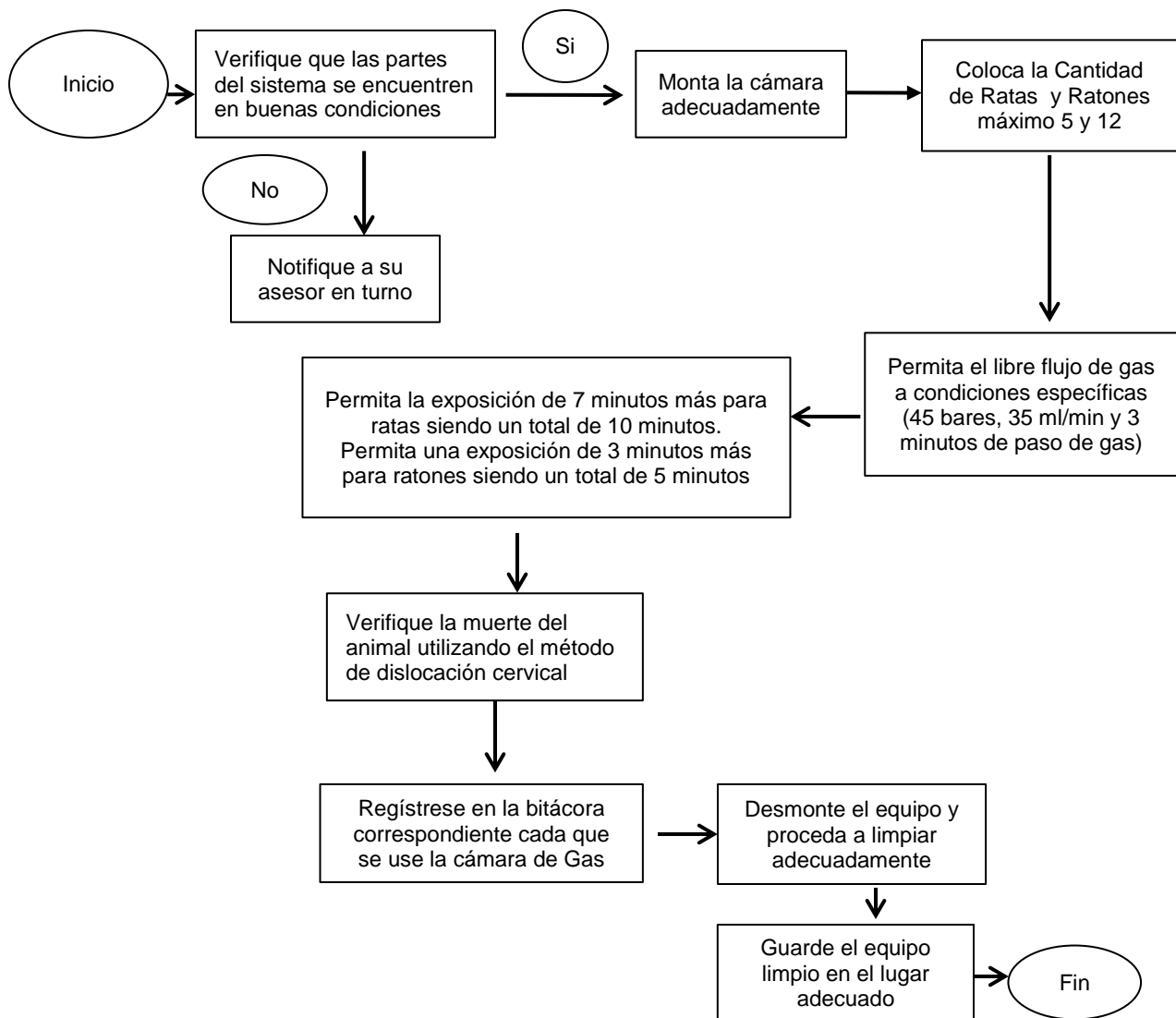
**6.1.12.** Desmunte las conexiones de la cámara de gas y retire la charola de residuos orgánicos.


**6.1.13.** Limpie la charola, base y el interior de la cámara con agua y jabón, seque con una franela seque.

	Procedimiento Normalizado de Operación Uso de la Cámara de Dióxido de Carbono (CO <sub>2</sub> )	Código / Revisión: PNO-EVA-00
		Página 1 de 5
		Departamento emisor: Evaluación de Fármacos y Medicamentos

**6.1.14.** Regístrese en la bitácora correspondiente, los usuarios que ocuparon el equipo, para llevar un control de la cantidad de gas que se ocupa por práctica.

## 7. DIAGRAMA DE FLUJO



	Procedimiento Normalizado de Operación Uso de la Cámara de Dióxido de Carbono (CO <sub>2</sub> )	Código / Revisión: PNO-EVA-00
		Página 1 de 5
		Departamento emisor: Evaluación de Fármacos y Medicamentos

## 8. HISTORICO DE CAMBIOS

No. DE REVISIÓN	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN
00	•Documento Nuevo

## 9. REFERENCIAS

**9.1** Schoell Adam HBTD. metodos de eutanasia para ratones en estudios farmacocineticos pulmonares tiempo-respuesta. Asociación Americana de Laboratorio de Ciencia Animal. 2009 Septiembre; 48(5).

**9.2** Norma Oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado. 1999.





## Referencias

1. Hawkins P, Prescott MJ, Carbone L, Dennison N, Johnson C, Makowska IJ, et al. A Good Death? Report of the Second Newcastle Meeting on Laboratory Animal Euthanasia. *Animals*. 2016; 6(9): 1-28.
2. Pritchett-Corning KR. Euthanasia of neonatal rats with carbon dioxide. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : (JAALAS)*. 2009;48(1):23-27.
3. Hwang CK, Iuvone PM. Technical brief: a comparison of two methods of euthanasia on retinal dopamine levels. *Molecular vision*. 2013;19:1122-1124.
4. Reed B, Varon J, Chait BT, Kreek MJ. Carbon dioxide-induced anesthesia results in a rapid increase in plasma levels of vasopressin. *Endocrinology*. 2009; 150(6):2934-2939.
5. Holson RR. Euthanasia by decapitation: evidence that this technique produces prompt, painless unconsciousness in laboratory rodents. *Neurotoxicology and teratology*. 1992;14(4):253-257.
6. Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-ZOO-069 Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. 1999.
7. Leary S, Underwood W, Anthony R, Cartner S, Corey D, Grandin T, et al. AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2013.
8. Cartner SC, Barlow SC, Ness TJ. Loss of cortical function in mice after decapitation, cervical dislocation, potassium chloride injection, and CO2 inhalation. *Comparative medicine*. 2007;57(6):570-573.

9. Derr RF. Pain perception in decapitated rat brain. *Life sciences*. 1991;49(19):1399-1402.
10. Zhang H, Good DJ. Comparison of hypothalamic mRNA levels in mice euthanized by CO<sub>2</sub> inhalation and focused-beam microwave irradiation. *Lab animal*. 2011;40(10):313-318.
11. Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth E-M, Bromage N, Bunyan J, et al. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. *Laboratory animals*. 1997;31(1):1-32.
12. Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth E-M, Bromage N, Bunyan J, et al. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. *Laboratory animals*. 1996;30(4):293-316.
13. Estol L, Director CdV, Dugas R. *Manual Sobre el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación*. 1998.
14. Ballard T. Intraperitoneal route of administration-how accurate is this technique? *Animal Technology and Welfare*. 2009;8(1):17-28.
15. Coria-Avila GA, Gavrila AM, Menard S, Ismail N, Pfaus JG. Cecum location in rats and the implications for intraperitoneal injections. *Lab Anim Sci (NY)*. 2007; 36(7):25-30.
16. Zatroch KK, Knight CG, Reimer JN, Pang DS. Refinement of intraperitoneal injection of sodium pentobarbital for euthanasia in laboratory rats (*Rattus norvegicus*). *BMC veterinary research*. 2017;13(1):60.
17. Valentim AM, Guedes SR, Pereira AM, Antunes LM. Euthanasia using gaseous agents in laboratory rodents. *Laboratory animals*. 2015;50(4):241-53.

18. Conlee KM, Stephens ML, Rowan AN, King LA. Carbon dioxide for euthanasia: concerns regarding pain and distress, with special reference to mice and rats. *Laboratory animals*. 2005;39(2):137-161.
19. Hackbarth H, Küppers N, Bohnet W. Euthanasia of rats with carbon dioxide-animal welfare aspects. *Laboratory animals*. 2000;34(1):91-6.
20. Boivin GP, Bottomley MA, Dudley ES, Schiml PA, Wyatt CN, Grobe N. Physiological, behavioral, and histological responses of male C57BL/6N mice to different CO<sub>2</sub> chamber replacement rates. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science (JAALAS)*. 2016;55(4):451-461.
21. Shusterman D, Avila PC. Real-time monitoring of nasal mucosal pH during carbon dioxide stimulation: implications for stimulus dynamics. *Chemical senses*. 2003;28(7):595-601.
22. Brosnan RJ, Pham TL. Carbon dioxide negatively modulates N-methyl-d-aspartate receptors. *BJA: British Journal of Anaesthesia*. 2008;101(5):673-679.
23. Thomas AA, Flecknell PA, Golledge HD. Combining Nitrous Oxide with Carbon Dioxide Decreases the Time to Loss of Consciousness during Euthanasia in Mice Refinement of Animal Welfare? *PloS one*. 2012;7(3) 32290.
24. Putnam RW, Filosa JA, Ritucci NA. Cellular mechanisms involved in CO<sub>2</sub> and acid signaling in chemosensitive neurons. *American Journal of Physiology-Cell Physiology (AJPCELL-PHYSIOLOGY)*. 2004;287(6):149-152.
25. Djoufack-Momo SM, Amparan AA, Grunden B. Evaluation of Carbon Dioxide Dissipation within a Euthanasia Chamber. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science (JAALAS)*. 2014;53(4):404-407.

26. Niel L, Weary DM. Behavioural responses of rats to gradual-fill carbon dioxide euthanasia and reduced oxygen concentrations. *Applied Animal Behaviour Science*.100(3):295-308.
27. Rault J-L, McMunn K, Marchant-Forde J, Lay D. Gas alternatives to carbon dioxide for euthanasia: A piglet perspective. *Laboratory animal science (Lab Anim Sci)*. 2013;91(4):1874-1883.
28. Wren-Dail MA, Dauchy RT, Blask DE, Hill SM, Ooms TG, Dupepe LM, et al. Effect of Isoflurane Anesthesia on Circadian Metabolism and Physiology in Rats. *Comparative medicine*. 2017;67(2):138-146.
29. Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL. *The laboratory rat*: Academic Press; 2005.
30. Hedrich HJ. *The laboratory mouse*: Academic Press; 2012.
31. Lohmiller JJ, Swing SP. Reproduction and breeding. *The Laboratory Rat* 2nd Ed Elsevier Academic Press, London, UK. 2006;153-165.
32. Hofstetter J, Suckow MA, Hickman DL. Morphophysiology. *The laboratory rat*: Elsevier Inc.; 2006.15-50
33. Diario Oficial de la Fedeacion: Norma Oficial Mexica NOM-059-SSA1-2015, Buenas Prácticas de Fabricación de Medicamentos.
34. Hernández Sampieri R, Fernández Collado C, Baptista Lucio P. *Metodología de la investigación*. Sexta Edición. Editorial Mc Graw Hill. México. 2014.
35. Raj A, Leach MC, Morton DB. Carbon dioxide for euthanasia of laboratory animals. *Comparative medicine*. 2004;54(5):470-471.

36. Baumans V, Meijer J, Haberham Z, de Groot H, Hellebrekers L. Euthanasia of piglets: gas or injection Tijdschrift voor diergeneeskunde. 1998;123(24):738-742.
37. Hewett TA, Kovacs MS, Artwohl JE, Bennett B. A comparison of euthanasia methods in rats, using carbon dioxide in prefilled and fixed flow rate filled chambers. Laboratory animal science (Lab Anim Sci). 1993;43(6):579-582.
38. Makowska J, Golledge H, Marquardt N, Weary DM. Sedation or inhalant anesthesia before euthanasia with CO<sub>2</sub> does not reduce behavioral or physiologic signs of pain and stress in mice. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science. (JAALAS) 2012;51(4):396-407.
39. Valentine H, Williams WO, Maurer KJ. Sedation or inhalant anesthesia before euthanasia with CO<sub>2</sub> does not reduce behavioral or physiologic signs of pain and stress in mice. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science(JAALAS). 2012;51(1):50-57.
40. Hickman DL, Fitz SD, Bernabe CS, Caliman IF, Haulcomb MM, Federici LM, et al. Evaluation of Low versus High Volume per Minute Displacement CO<sub>2</sub> Methods of Euthanasia in the Induction and Duration of Panic-Associated Behavior and Physiology. Animals. 2016;6(8):45-55.
41. Danneman PJ, Stein S, Walshaw SO. Humane and practical implications of using carbon dioxide mixed with oxygen for anesthesia or euthanasia of rats. Laboratory Animal Science (Lab Anim Sci). 1997;47(4):376-385.