



Universidad Nacional Autónoma de México

Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

**Directrices para una investigación de calidad basada en la
comprensión del modelo animal**

Mediante la modalidad de Diagnóstico situacional

Que para optar por el grado de:

Maestro en Medicina Veterinaria y Zootecnia

Presenta:

MVZ. Mario Enrique Navarro Guillén

Tutor principal:

M. en C. Isabel Gracia Mora (Facultad de Química, C.U.)

Comité tutor:

Dra. Sara del Carmen Caballero Chacón (FMVZ, C.U.)

M. en C. Marisol Rivera Huerta (FMVZ, C.U.)

Ciudad Universitaria, CDMX, Mayo del 2022



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.

“...es ampliamente reconocido que el tratamiento más humano posible de los animales, lejos de ser un obstáculo, es actualmente un prerequisite para un experimento exitoso con el uso de animales”.

M.S. Russell y R.L. Burch

Índice de contenido

Glosario	1
Introducción	4
Experimentación de calidad	5
El proceso experimental	6
Antecedentes	8
Control genético de los roedores de laboratorio	16
Animales exogámicos	22
Animales endogámicos	26
Control generacional de una cepa	30
Cruzamiento entre cepas	38
<i>Cepas congénicas</i>	38
<i>Roedores híbridos</i>	40
<i>Roedores genéticamente modificados</i>	41
Calidad microbiológica de los roedores de laboratorio	48
Animales haloxénicos	48
Animales miroxénicos	49
Animales gnotobióticos	49
Animales heteroxénicos (SPF y SOPF)	50
Animales axénicos	51
Bioética en la experimentación con animales	54
Las tres R's en la experimentación con animales	59
Punto final humanitario	61
Reconocimiento y evaluación del dolor en los animales	64
Medio ambiente y su relevancia en un experimento	77
Conclusiones	85
Referencias	87

Índice de Ilustraciones

Ilustración 1.- Procedimiento de lesión en la médula de un ratón C57BL/6	12
Ilustración 2.- Clarence Cook Little con su cepa de ratón DBA	14
Ilustración 3.-Ratón C57BL/6	16
Ilustración 4.- Control genético por morfología esquelética	20
Ilustración 5.- Ratón ICR	24
Ilustración 6.- Técnica de Isoinjerto	29
Ilustración 7.- Generación de una cepa congénica	39
Ilustración 8.- Ratón híbrido B6129SF1/J	41
Ilustración 9.- Técnica de microinyección pronuclear para la generación de animales transgénicos	46
Ilustración 10.- Russell y Burch	61
Ilustración 11.-Escala de Grimace en ratas	68

Índice de Tablas

Tabla 1.- Grado de sensibilidad al dolor por región anatómica del roedor de laboratorio	71
Tabla 2.- Grado de severidad por procedimiento	72
Tabla 3.- Puntuación para determinar la aplicación del punto final humanitario	74
Tabla 4.- Parámetros medioambientales para roedores de laboratorio.	79

Índice de Esquemas

Esquema 1.- Endocría en línea única	33
Esquema 2.- Cruzamiento en líneas paralelas.	37

Glosario

- Animal de laboratorio.- Es todo aquel ser vivo no humano, vertebrado o invertebrado con características específicas propias de su especie, cepa o estirpe que se puede utilizar para la experimentación u otros fines científicos debido a su analogía fisiológica con la especie humana. **(Romero, et al. 2016)**.
- Experimento.- En el ámbito científico, un experimento es el estudio en el que se manipulan intencionalmente una o más variables independientes o supuestas causas antecedentes para poder analizar las consecuencias que tiene su manipulación sobre una o más variables dependientes o supuestos efectos-consecuentes **(Hernández, et al. 2014)**.
- Bienestar animal.- Es el término que designa el estado físico y mental de un animal relacionado con las condiciones en las que vive y muere **(OIE, 2021)**.
- OIE.- Organización Mundial de Sanidad Animal
- Medicina traslacional.- Es la rama biomédica compuesta por varias disciplinas y constituida por: el trabajo de laboratorio, el trabajo clínico y la comunidad con el objetivo de combinar recursos, conocimientos y técnicas para promover mejoras en la prevención, diagnóstico y tratamiento de las enfermedades

(Oyarzún, 2017).Reproducibilidad.- Es el efecto físico o resultado estadísticamente significativo de un experimento que se puede repetir de manera regular sin más que llevando a cabo el experimento de manera apropiada al modo prescrito en su protocolo (Velasco, 2020).

- Trazabilidad.- Es la capacidad de poder reunir, utilizar y localizar un artículo o una actividad por medio de su identificación que sirve de registro **(FAO, 2016)**.
- Homocigosis.- Es el término que se refiere a cuando dos genes que codifican para la expresión un carácter, son idénticos u homólogos. Un individuo puede ser al mismo tiempo homocigótico para un carácter y heterocigótico para otro **(Freeman, 2000)**.
- Estrés.- De acuerdo con el fisiólogo austrohúngaro Hans Selye; “es la repuesta no específica del cuerpo a cualquier demanda que sobre él se ejerce”. Esta respuesta se caracteriza por ser un esfuerzo adaptativo mediado por una reacción inespecífica. **(Barrio, et al. 2006)**.
- Distrés.- También denominado distress, es la “transición” del estrés que se presenta de manera crónica y en aumento de intensidad hacia un estado aversivo y negativo con el que los procesos de homeostasis fallan al intentar adaptarse al medio estresor afectando al bienestar del animal **(Góngora, 2010)**.

- Comunicación conespecífica.- Dos organismos son conespecíficos cuando pertenecen a la misma especie y a la forma particular de cada especie de transmitir información por medio de vocalizaciones y gestos se le llama comunicación conespecífica **(Torretti, 2010)**.
- Cepa.- Una cepa o “línea”, puede definirse como la línea consanguínea de un animal obtenido por cruzamiento entre parientes también conocido como endogamia; con un nivel de consanguinidad del 98.7% en un plazo de 20 generaciones **(Padmanabhan, 2014)**.
- Estirpe.- De acuerdo con el proveedor de roedores de laboratorio “The Jackson’s laboratory”¹. Una estirpe, es aquella población de animales genéticamente “indefinidos” con un alto porcentaje de heterocigosis obtenido por cruzamientos aleatorios no emparentados conocidos como cruzamientos exogámicos, por lo tanto, ningún individuo será genéticamente igual a otro en dicha población.

¹ Puede consultar la fuente directamente escaneando el siguiente código QR:



- Polimorfismo.- Puede definirse como una población de genes con distintos alelos para un locus determinado en distintos organismos. Siendo que los alelos son variaciones de la secuencia del ADN presentes en una posición definida (locus) en un cromosoma de una célula diploide (**Torrades, 2002**).

Introducción

Experimentación de calidad

El presente trabajo es una revisión bibliográfica que trata no sólo sobre el bienestar animal, sino además, de los aspectos que debemos procurar para aumentar la calidad en la investigación que puede determinar su reproducibilidad, trazabilidad y precisión. Intenta ayudar al investigador a encontrar en un sólo manual, aspectos críticos de la calidad en el insumo biológico más importante de la experimentación preclínica, el animal de laboratorio, observando en todo momento el cumplimiento del principio de las 3 R's de Rusell y Burch introducido desde 1959 (reemplazar, reducir y refinar).

La investigación biomédica básica y medicina traslacional (también llamada investigación traslacional) de calidad requiere la idoneidad del modelo experimental y que, durante el proceso experimental, se conserve el bienestar del modelo biológico que se utiliza. El bienestar animal describe un estado de alta calidad de vida basada en la consideración y promoción de aspectos que promuevan un estado fisiológico y conductual digno hacia los animales. Por ello, el investigador está obligado a garantizar la mejor condición posible de los animales utilizados en sus experimentos guiado por el incentivo creciente de una investigación de calidad.

El proceso experimental

El término de “proceso experimental” se refiere a cualquier acto que pueda ocasionar en un animal un nivel de dolor, angustia o sufrimiento equivalente o mayor que la introducción de una aguja hipodérmica (**ASPA, 2010**). Es así como todos los experimentos llevan a cabo estos procesos, no así que todos los procesos sean experimentos. Entonces, para comprender que el proceso experimental es concomitante a la calidad del bienestar animal, debemos tener en cuenta a todos aquellos elementos con el potencial suficiente para alterarlo. Existen modelos como el de “Los 5 dominios de bienestar animal” propuesto por Mellor y Reid en 1994, que describe la evaluación del bienestar animal mediante el monitoreo de su estado físico y mental con base en los siguientes indicadores también conocidos como “dominios” para su evaluación integral: nutrición, salud, ambiente y comportamiento que conforman el estado físico, así como los sentimientos y las emociones para la evaluación del estado mental (**Maschi, et al. 2019**). Por ejemplo, la privación prolongada del dominio de nutrición por medio de la restricción de alimentos puede perjudicar el bienestar animal de forma directa por la sensación de hambre crónica e intensa en el animal generando un estado sostenido de estrés y también puede afectar de forma indirecta debido a que aumenta la vulnerabilidad del individuo ante enfermedades metabólicas y carenciales relacionadas con el dominio de la salud (**Mellor, et al. 2015**), todas las formas de afección deben ser consideradas para la

evaluación integral del bienestar animal aplicable en todo proceso experimental para generar resultados de calidad.

Una vez introducido el concepto del proceso experimental y el sufrimiento animal que conlleva, es imperativo concientizar sobre la importancia de realizar un experimento con base en el principio de las tres erres acuñados por Willian Russell y Rex Burch: “Reducir, Reemplazar y Refinar”; aunque el tercer término de este principio en ocasiones puede ser complejo de evaluar, debe considerarse crucial. El objetivo principal del Refinamiento es minimizar la severidad del dolor y el sufrimiento que se causa al animal a través de los procedimientos² empleados durante el proceso³ de experimentación, por ejemplo: la estandarización genética y control microbiológico de los animales utilizados.

La severidad de un proceso puede determinarse por la intensidad y duración del dolor al que se expone el animal de manera individual durante el transcurso de un procedimiento y puede clasificarse de la siguiente manera (**Smith, et al. 2018**):

- a) Leve: A todo procedimiento en animales que ocasione un dolor de intensidad mínima por un corto periodo de tiempo, así como los procedimientos que no ocasionen un deterioro significativo de su estado basal fisiológico.

² Procedimiento: De acuerdo con la RAE, Método de ejecutar algunas cosas. Por lo tanto, va dirigido hacia tareas con objetivos específicos pudiendo ubicarse dentro de un proceso.

³ Proceso: De acuerdo con la RAE, es el conjunto de las fases sucesivas de un fenómeno natural o de una operación artificial. Por lo tanto, cumple con un objetivo generalizado.

- b) Moderado: Los procedimientos en animales que provoquen dolor, angustia o sufrimiento de corta duración o leves pero duraderos que generen un deterioro mayor y por tiempo más prolongado comparado con los procesos de severidad leve.
- c) Grave: A los procedimientos que generen un dolor intenso por periodo corto de tiempo o dolor moderado por un periodo prolongado causando una alteración grave del estado general de los animales.
- d) No recuperación: Todo procedimiento que se realiza bajo anestesia general a partir del cual el animal no debe de volver en sí recuperando la conciencia.

Con el aporte de los aspectos críticos en este documento, para elección del modelo biológico correcto con base en su calidad genética y microbiológica, se busca que el proceso experimental se dirija hacia una investigación más refinada y ética ya que es imprescindible para la obtención de resultados reproducibles, confiables y trazables sin perder de vista los aspectos relacionados con el bienestar animal en todo momento.

Antecedentes

De acuerdo con la FDA, existe un sesgo en la investigación con el uso de modelos biológicos que afecta al 92% de estudios en fármacos, de tal forma que, muchos de estos no llegan al mercado debido al sesgo en los procesos experimentales llevados a cabo incluyendo estudios pivotaes, obteniendo resultados sin validez, reproducibilidad y trazabilidad en los experimentos **(Akhtar, 2015)**. Esto se debe a la falta de comprensión sobre los modelos biológicos que se utilizan en dichos experimentos, siendo que los ratones y ratas de laboratorio siempre han constituido un gran porcentaje del número total de los animales utilizados en experimentación, representando al 95% del número total de animales utilizados de acuerdo con la fundación de investigación biomédica o FBR⁴ por sus siglas en inglés.

El modelo animal debe considerar el estudio de los fenómenos biológicos y etológicos para investigar un proceso patológico inducido o espontáneo que reproduzca el proceso fisiopatológico humano **(Monteiro, 2014)**. El ratón de laboratorio proporciona resultados análogos y comparables a lo que sucedería con un humano durante un proceso experimental, debido a que los humanos y los ratones presentan patrones similares en los

⁴ Puede consultar la fuente directamente escaneando el siguiente código QR:



cuadros patológicos debido a que su fisiología celular y estructuras moleculares son similares **(Dutta, 2016)**, por lo que casi el 59% de la experimentación basadas el uso de animales recurre al modelo murino (*Mus musculus*). La rata de laboratorio (*Rattus norvergicus*) es un modelo biológico imprescindible en la investigación biomédica debido a su similitud con la fisiopatología humana. Es el modelo biológico de elección en campos como la toxicología, teratología, oncología, gerontología y neurociencias. Una estimación del uso de roedores de laboratorio en procesos experimentales sugiere que aproximadamente el 20% del total de animales utilizados en experimentación, incluidos los estudios etológicos debido a su docilidad y manejo, son ratas **(Sengupta, 2012)**. Los roedores de laboratorio considerados animales de talla pequeña, tienen ventajas económicas sobre especies de mayor tamaño debido a su menor costo de producción, alimentación, instalaciones para su albergue, entre otros aspectos que disminuyen el costo de una investigación. Además, se han logrado desarrollar técnicas *in vitro* que permiten la utilización de menor cantidad de animales (Refinamiento, Reducción y Reemplazo), por ejemplo: en estudios de toxicología en los que se requiere de dos especies de animales, son ampliamente utilizados. Así pues, si consideramos a ratas y ratones, representan al 79% de la experimentación animal con el uso del modelo *in vivo*.

La elección correcta del roedor de laboratorio como modelo biológico con base en su calidad genética y microbiológica para los experimentos es imprescindible debido a que, si no se elige

de manera correcta, entonces no podremos saber con precisión las respuestas de estos animales ante la administración de un fármaco, estímulo o inoculación de algún agente específico y no será reproducible ni confiable generando un sesgo en los resultados⁵. De esta forma no podremos cumplir el principio de las tres R's: "Reducir, Refinar y Reemplazar", mismo que se describe en el apartado específico de este documento⁶ que debe de regir todo experimento con el uso de los animales. Por ejemplo, el uso de la cepa de ratones C57Bl/6 (**Tator,2012**) comprados a diferentes proveedores, puede presentar respuestas diferentes a un mismo tratamiento. Zhang en 2014, señala en su estudio donde se revisaron las respuestas de ratones antes estímulos nociceptivos para obtener medidas de sensibilidad al dolor y usarlas como marcadores de lesión en la médula espinal (Figura 1). Las respuestas variaron entre las cepas de ratones de diferentes proveedores, sin patrones claros que permitieran predecir como respondería la cepa. Estas diferencias entre las cepas influyen sobre la forma en que los animales respondieron a la lesión y a las terapias experimentales debido a que un fármaco ayuda a una cepa de ratones a recuperarse de la lesión en la médula, pero a otra de diferente proveedor, no.

⁵ Sesgo: Es la diferencia en la distribución de los datos obtenidos de un proceso que va de la mano con su simetría pudiendo ser representado con una campana de Gauss.

⁶ Encontrarás el apartado en la página 58 de este escrito.

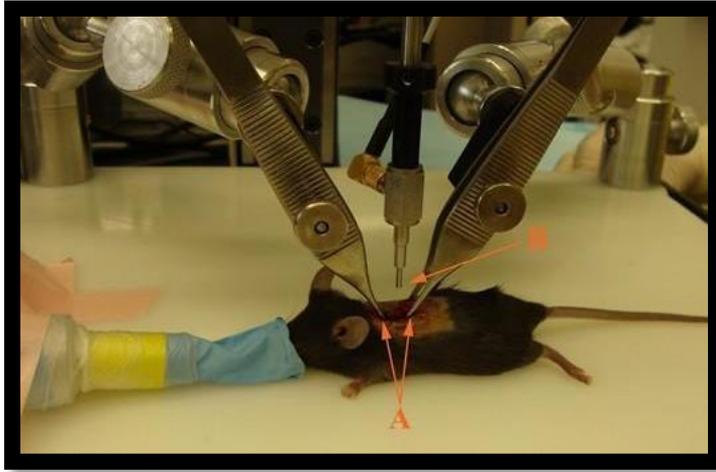


Ilustración 1.- Procedimiento de lesión en la médula de un ratón C57BL/6⁷

La letra A, los sujetadores vertebrales y con la letra B, el bisturí láser.

El objetivo principal de este escrito está sustentado en la obligatoriedad sobre la comprensión y elección correcta del modelo biológico para la investigación con base en su calidad genética y microbiológica, específicamente en las ratas y ratones de laboratorio mediante la compilación de sus características, cuidados y fines específicos de las diferentes estirpes y cepas existentes, debido a que en México no existe un documento con la puntualidad de las directrices que este trabajo dedica a la

⁷ Imagen obtenida de <https://bio-protocol.org/e886?action=Questions>
Puede consultar la fuente directamente escaneando el siguiente código QR:



comprensión del modelo biológico en la experimentación y su impacto en la investigación con el uso de roedores de laboratorio.

Se observan los siguientes objetivos particulares:

- Señalar la relevancia del uso y elección correcta del modelo biológico específico para la investigación.
- Describir las diferencias entre estirpes y cepas de los roedores de laboratorio y la importancia del control genético.
- Reconocer la importancia en la certificación de calidad microbiológica de un roedor de laboratorio para una investigación.
- Relacionar la correcta elección del modelo biológico con los principios de las 3R's y el bienestar animal.

La demanda de modelos animales de alta calidad genética, junto con la crítica frente al uso de modelos animales, ha llevado a la creación de una rama de la ciencia denominada como “Ciencia de los animales de laboratorio” (**Baumans, 2005**) regida por el Principio de las Tres Erres de Russell y Burch, quienes señalaron la importancia de reemplazar, reducir y refinar los experimentos con el uso de animales de laboratorio.

El control genético de los modelos biológicos de roedores utilizados en la experimentación tiene su origen con la creación de la primera cepa por el investigador Clarence C. Little, en 1909 con la línea DBA que actualmente se emplea en áreas de investigación como biología cardiovascular, neurobiología e

investigación sensorineural. En ese mismo año, la investigadora Helen D. King dio origen a las primeras líneas consanguíneas de rata, como son las cepas albinas WKA y PA.

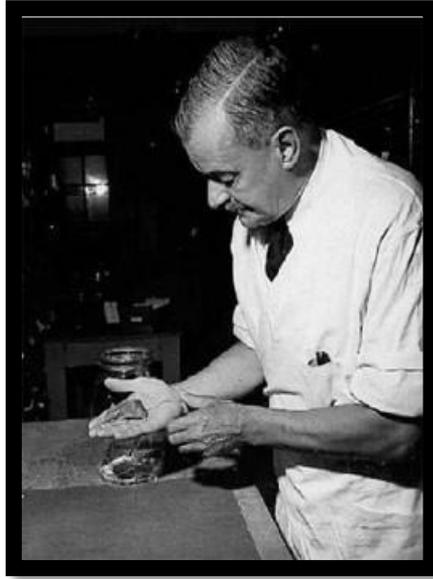


Ilustración 2.- Clarence Cook Little con su cepa de ratón DBA⁸

Posteriormente, para el año de 1918, Little se mudó al Laboratorio Cold Spring Harbor de Nueva York, en donde comenzó con el cruzamiento endogámico de ratones dando origen a las cepas más conocidas incluyendo la C57BL/6, C57BL/10, C3H, CBA y BALB/c a partir de las cuales, de acuerdo con la Sociedad

⁸ Imagen obtenida de: <https://www.nature.com/articles/431022a>

Puede consultar la fuente directamente escaneando el siguiente código QR:



Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL), se han obtenido más de 150 generaciones de endocría hasta la fecha. Uno de los principales proveedores de cepas de ratones en el mundo es The Jackson's Laboratory que fue fundada por Clarence C. Little en 1929 donde actualmente cuentan con 12,000 cepas de ratones utilizados como modelos en diferentes estudios en todo el mundo. La relevancia en la variedad de las distintas cepas que el investigador tiene a disposición radica en la comprensión del modelo biológico que utilizará en un proyecto de experimentación. El surgimiento de animales endogámicos con un control genético y microbiológico específico ha conducido a la investigación hacia nuevas metodologías y modificaciones de sus predecesoras, que atestiguan un cambio innegable de la comunidad científica en el uso de animales para la experimentación que se dirige hacia técnicas más eficientes y éticas (**Farnaud, 2009**) procurando en cada experimento el bienestar de los animales, es por esto que la selección del modelo animal apropiado es un primer paso crucial en un programa de investigación. Por ejemplo, el ratón C57BL/6 (B6) es la cepa de ratón más utilizada en la investigación biomédica, también se utilizan en estudios de comportamiento. Sin embargo, existen varias subcepas de los C57BL, todas derivadas de ancestros comunes. Los ratones C57BL/10 (B10), que son fenotípicamente idénticos a los ratones C57BL/6 y se utilizan ampliamente en la investigación de los procesos inflamatorios y de inmunología, aunque rara vez en estudios de comportamiento debido a que los ratones B10 difieren ampliamente en las pruebas de cognición,

comportamientos típicos de las especies y coordinación motora, la cepa B6 tiene un mejor desempeño en estas áreas (**Deacon, 2007**).

Con base en lo anterior, cuando el investigador, docente o alumno que desee realizar un estudio de comportamiento entonces podrá hacer uso de esta herramienta para la elección correcta de su modelo poder obtener resultados válidos y reproducibles cumpliendo con el principio de las 3 R's satisfactoriamente.



Ilustración 3.-Ratón C57BL/6⁹

⁹Imagen obtenida de www.jax.org/strain/003548

Puede consultar la fuente directamente escaneando el siguiente código QR:



Control genético de los roedores de laboratorio

La garantía de la calidad de los roedores de laboratorio genéticamente definidos debe de ser un componente esencial para cualquier programa de investigación con modelos biológicos. El control de la calidad genética es tan importante para asegurar la validez del modelo animal, como lo es el control de calidad microbiológica, de tal manera que, debería de exigirse que los estudios experimentales en los que se requiera utilizar de manera puntual a roedores de laboratorio, principalmente ratones y ratas, se utilicen exclusivamente animales genéticamente definidos **(Benavides, 2019)**.

La diferenciación entre cepas de animales endogámicos y estirpes de animales exogámicos debe ser comprendida mediante dos primeros conceptos; a) La consanguinidad y b) La variabilidad genética, para poder definir correctamente la finalidad de un modelo biológico y su calidad genética. La consanguinidad refiere al grado de parentesco entre los individuos de una cepa o estirpe; hay cepas debido a su alta consanguinidad que alcanza hasta un 98.7%. La variabilidad genética corresponde a la diferencia en la frecuencia de genes entre individuos y se relaciona a términos como el vigor híbrido, que se explicará más adelante en el apartado de animales exogámicos y estirpes.

Durante la generación de una línea consanguínea puede ocurrir un fenómeno llamado depresión endogámica ocasionada completamente al azar por el arreglo de alelos no deseados que

expresa características no deseadas, este fenómeno manifiesta con una baja en la fertilidad y una menor adaptación al medio, que, aunque no es tan severa como en otras especies de mamíferos, puede ocurrir en las primeras generaciones de endocría, desapareciendo completamente una vez que una cepa se establece mediante la fijación de alelos al azar (**Benavides, 2014**). Es imprescindible la correcta elección y diferenciación entre cepas y estirpes dadas sus características para un experimento; por ejemplo, utilizar roedores exogámicos de manera indiscriminada en experimentos, sin conocer su valor genético, afectará de manera negativa la calidad de los resultados, incluidos los estudios de eficacia farmacológica, que son la base para determinar la susceptibilidad y la resistencia farmacológica. La homogeneidad de las respuestas del modelo biológico será pobre y esto estadísticamente hablando, ocasiona un sesgo que a su vez disminuye el nivel de confianza en los resultados. Aunado a este supuesto en que un experimento sin validez es aquel que no observa el bienestar de los animales ni se rige por el principio de las 3R's, la falta de comprensión del modelo biológico utilizado afectará de forma negativa al coste efectivo en el largo plazo provocando pérdidas monetarias.

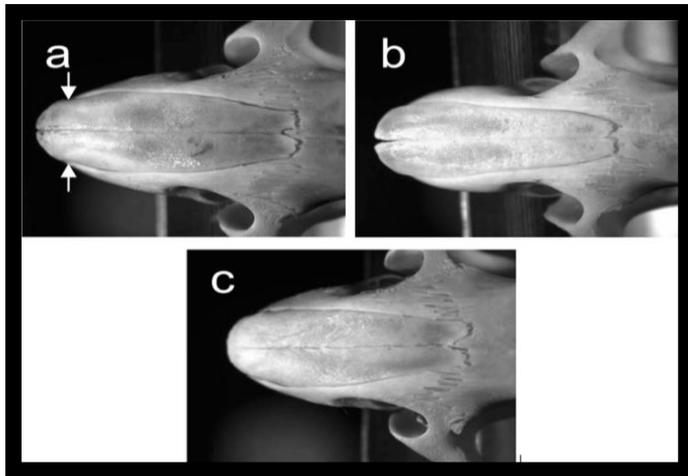
Es fundamental hablar sobre los modelos exogámicos, ya que un aproximadamente del 75% de las ratas y ratones utilizados en la investigación, al menos en Estados Unidos, pertenecen a animales exogámicos o estirpes, conocidos en inglés con el término de "outbred o random bred stocks" y también denominados animales exocriados. Su uso en la investigación es

de gran relevancia debido a su vigor híbrido (Tortajada, 2015) que puede definirse por la expresión de algunas características como la alta prolificidad, buena conducta materna, temperamento dócil para su manejo en laboratorio y su precio es más accesible comparado con el de una cepa. Siempre debe de tenerse en cuenta que una estirpe no es una línea de animales genéticamente definidos, debido a su alta variabilidad genética, que de ahí desprende su relevancia en la experimentación. En el apartado de animales exogámicos se describe el papel de las estirpes de roedores de laboratorio a detalle y su importancia para la investigación, así como del correcto manejo para obtener resultados confiables y reproducibles con el uso de estirpes.

El control genético es un conjunto de técnicas que permite comprobar que los animales que estamos utilizando en un experimento, conservan las características genéticas originales de su línea. Los principales objetivos de un programa de calidad genética son: Comprobar la autenticidad y uniformidad de las cepas y estirpes, detectar una posible contaminación genética y describir con precisión la composición genética de las cepas de ratones y ratas genéticamente definidas. El estándar de oro para el control genético de la calidad de los roedores de laboratorio depende de los marcadores genéticos lo suficientemente polimórficos como para poder distinguir el origen genético entre cepas; dichos marcadores son secuencias de ADN específicas de un locus. Las diferentes técnicas de control genético utilizadas en los animales de laboratorio, aplicadas a las ratas y ratones de

laboratorio que son el t3pico principal de este escrito, y son las siguientes:

1. Isoinjerto
2. Identificaci3n de genes de pigmentaci3n
3. An3lisis de polimorfismo qu3mico
4. Morfolog3a esquel3tica
5. An3lisis de histocompatibilidad
6. An3lisis de DNA gen3mico



Ilustraci3n 4.- Control gen3tico por morfolog3a esquel3tica¹⁰

¹⁰ Imagen obtenida de:

<https://journals.plos.org/plosone/article/figure?id=10.1371/journal.pone.0037721.g001>

Puede consultar la fuente directamente escaneando el siguiente c3digo QR:



Para el marcador de control genético de morfología esquelética ejemplificada con la imagen previa, muestra una radiografía del hueso nasal en ratones congénicos¹¹ IRCS/66H (C) obtenidos de la cruce de C57Bl/6 (A) x SEG (B), en donde las flechas señalan el segmento de la depresión rostral del hueso nasal de los ratones C57Bl/6; característica que se busca heredar en la descendencia endogámica de estos ratones (**Burgio, 2012**)

Para el análisis de ADN genómico, podemos dividir este último control en tres categorías:

1. Caracterización.- Se refiere a poder describir el genotipo de una cepa nueva, analizando el mayor número de loci posible.
2. Control tipo I: se emplea sólo para confirmar el perfil genético de una cepa.
3. Control tipo II: se analiza un grupo mínimo de loci seleccionados especialmente se utiliza para discriminar entre varias cepas. Este control debería de aplicarse de manera periódica en los bioterios que manejen sistema de endocría.

Una colonia debe ser controlada genéticamente en dos casos:

1. Al establecer una colonia nueva

¹¹ Un animal congénico es típicamente generada por retrocruza para la fijación de un carácter específico que pasa de la cepa “donadora” a una cepa “recipiente” (**Olson, et al. 2014**).

2. Cuando se sospecha de contaminación genética. Asimismo, un control de rutina debe de estar presente en aquellas colonias con alto riesgo de contaminación; por ejemplo: aquellas que mantienen más de una cepa simultáneamente como BALB/c y B6 en la misma habitación.

Una forma de ver si nuestros animales han sufrido contaminación genética es mediante observaciones como baja en la prolificidad, agresividad, particularidades fisiológicas y heterogeneidad de respuesta a medicamentos en un experimento (**Benavides, 2014**).

Animales exogámicos

Como ya se ha mencionado, alrededor del 75% de los animales utilizados en experimentación son ratas y ratones, por lo menos en los Estados Unidos, y son provenientes de colonias no consanguíneas obtenidas por sistemas de exocría. La gran popularidad para su uso en experimentos se debe especialmente a que su precio es más accesible comparado con el de un animal genéticamente estandarizado o consanguíneo. Para mantener la variabilidad genética y el vigor híbrido presente en una colonia exogámica, no debe sobrepasarse el 1% de coeficiente de endogamia por generación mediante la cruce de animales no emparentados. Es importante conocer, dado el hecho que una estirpe se conforma de animales genéticamente no

estandarizados, que su crianza no será menos laboriosa que la de un animal endogámico; por el contrario, en una colonia cerrada será más difícil llevar a cabo la exocría y dependerá del tamaño inicial de la colonia, por lo que se debe de contar por lo menos con 80 parejas fundadoras para que el coeficiente de endogamia no supere el 10% dentro de las 20 generaciones que conformen a nuestra estirpe. Existen varios sistemas de exocría para mantener la heterocigosis de una estirpe dependiendo del número de animales en la colonia; por ejemplo, el sistema de exocría Poiley es de tipo rotativo y se ajusta bien a colonias grandes o el sistema Han, que intercala una o dos veces las generaciones de apareamiento y que es más adecuado para colonias pequeñas.

Las poblaciones exogámicas o estirpes difieren de las poblaciones endogámicas o cepas debido a su heterocigosis. Comparados con las cepas o híbridos F1, la constitución genética de un animal tomado al azar de una población exogámica no se conoce *a priori*. Sin embargo, comparten ciertas características fenotípicas y de comportamiento entre las que destacan el color albino en la mayoría de las estirpes, buena capacidad materna y mayor facilidad de manejo comparado con otras cepas. Estas características, convierten a algunas estirpes en animales utilizados como nodrizas o madres adoptivas para técnicas de reproducción asistida. Por ejemplo, ratones como el ICR (CD-1) que se deriva del ratón original Suizo importado a Estados Unidos por Clara J. Lynch en 1926 y el ratón CF-1 obtenido de Carworth en Missouri, actualmente distribuido por Charles River. Algunas

estirpes de ratas utilizadas en experimentación son Sprague Dawley, Wistar y Long-Evans. Estas estirpes de roedores de laboratorio no están genéticamente estandarizadas, el control de calidad de estos animales se basa principalmente en la evaluación del fenotipo como el color del pelaje, tamaño y características reproductivas. Debido a esta heterocigosis en las estirpes, son similares a las poblaciones humanas y por ello su principal uso dentro de la experimentación, es el de estudios toxicológicos y de seguridad farmacológica (**Chia, 2005**).



Ilustración 5.- Ratón ICR¹²

¹² Imagen obtenida de: <https://www.envigo.com/model/hsd-icr-cd-1>

Puede consultar la fuente directamente escaneando el siguiente código QR:



El ratón ICR, es utilizado ampliamente para investigación en estudios de toxicología, oncología, teratología, inmunología, entre otros.

Las estirpes antes mencionadas son las que mejor representan la variabilidad genética o heterocigosis dentro de una población humana. Esta característica las vuelve imprescindibles para los estudios de toxicología y farmacología, sin embargo, se ha comprobado que también se puede obtener mayor variabilidad utilizando un conjunto de líneas consanguíneas. De tal forma que, se puede generar variabilidad produciendo animales híbridos F1 entre cepas; por ejemplo, la cruce híbrida entre ratones AKR x BALB/c y C3H x DBA, posteriormente se realiza una cruce entre la progenie híbrida de estas cepas para poder producir un tipo de roedor llamado híbrido multicruza conocido también como “multi-cross hybrid” obtenido por un cruce de cuatro vías o “four way cross” que genera un alto polimorfismo que asemeja más al de una población humana. Existen algunos estudios en donde el uso de estirpes es más representativo que el de una cepa; por ejemplo, el uso de la cepa de ratas Zucker y la estirpe de ratas BB (Biobreeding Diabetes-Prone) como modelos para estudios de diabetes poblacional se debe a la semejanza en el tipo de respuesta que obtendremos del estudio con una población humana que es regida por la heterocigosis (**Benavides, 2014**).

Animales endogámicos

El Comité Internacional de Nomenclatura Genética Estandarizada para Ratones y el Comité de Nomenclatura del Genoma de la Rata define que una cepa es aquella colonia que se ha generado a partir del apareamiento sistemático consanguíneo entre hermanos con hermanas o de padres más jóvenes con descendencia, durante 20 o más generaciones, por lo que los individuos de la cepa tienen trazabilidad de al menos 20 generaciones provenientes de una pareja en común. De esta manera, los animales resultantes se consideran isogénicos; los animales isogénicos se pueden considerar genéticamente idénticos con el 98.7% de homocigosis. Hay estudios que estiman que para alcanzar una homocigosis del 99% se necesitan al menos 24 generaciones y 36 generaciones para alcanzar una isogenicidad casi perfecta. **(Simecek, 2017)**. Un animal Isogénico es histocompatible, esto es, que acepta de manera permanente trasplantes de tejido de cualquier individuo de la misma cepa debido a que además de ser consanguíneos, son homocigóticos en casi todos los *loci* genómicos de tal forma que cada cepa presenta una variedad de alelos única generada de manera aleatoria que varía entre cepas. **(Guenet, 2015)**. La histocompatibilidad de los mamíferos es mediada por el Complejo mayor de histocompatibilidad o “MHC”, por ejemplo: El complejo de antígeno leucocitario humano o “HLA” ubicado en el brazo corto del cromosoma 6, en el ratón se llama Complejo H2 y se

encuentra ubicado en el cromosoma 17 (**Trujillo, et al. 2017**), este complejo contiene genes polimórficos¹³ fundamentales para la activación de la respuesta inmunológica en el organismo gracias a la producción de proteínas específicas. La principal característica de las moléculas del H2 es su capacidad de unirse a péptidos para formar las estructuras que interactúan con el Receptor de linfocitos T o “TCR” y así activar la respuesta inmune, siendo que el H2 tipo 1 montará respuesta inmune mediada por linfocitos CD8 y el H2 tipo 2 presentará moléculas para poder montar una respuesta mediada por linfocitos CD4 (**Stuart, 2015**)

El porcentaje de consanguinidad puede medirse mediante el uso del coeficiente de consanguinidad expresado con la letra F; siendo la probabilidad de que dos alelos en un *locus* sean idénticos a la generación anterior, es decir que sean una réplica exacta de un mismo alelo ancestral en común. Entonces, la consanguinidad de una cepa es de $F=98.7\%$ que se alcanza en la veinteava generación de endocría y se ha calculado que, a partir de la cuarta generación, el 19% de *locus* heterocigotos se vuelven homocigos para uno de los alelos entre generaciones. De esta manera, después de 20 generaciones, la cantidad de *locus* que aún no se han vuelto homocigos es menor al 1.3% conocido como heterocigosis residual (**Mai, 2012**). Esta práctica para generar animales genéticamente estandarizados o definidos conduce a la disminución altamente deseable en la variabilidad de las respuestas ante estímulos controlados en un experimento

¹³ Se dice que un gen es polimórfico cuando más de un alelo ocupa un *locus*.

pero con el riesgo de poder generar mutaciones espontáneas; una mutación espontánea es aquella que ocurre de manera “natural” por la fijación de alelos nuevos y que se da mayormente entre cruzamientos consanguíneos o endocría, dos de las principales causas son la desaminación de la citosina al uracilo y errores de copia durante la replicación del ADN (**Lodish, et al. 2000**). Luego de varias generaciones de endocría, existe un 25% de probabilidad de que sea fijada al reemplazar el alelo original, y un 75% de que sea eliminada de la colonia, es por ello que es indispensable continuar endocría en forma constante aún después de la veinteava generación para poder eliminar mutaciones no deseadas y disminuir la heterocigosis residual en nuestra cepa. Un ejemplo de mutación espontánea deseada en un modelo animal es la alopecia de los ratones *nu/nu* dada por un alelo homocigo recesivo en el cromosoma 11 y que fue observada por primera vez en 1966 en Glasgow, Escocia (**Carbone, 2006**).



Ilustración 6.- Técnica de Isoinjerto¹⁴

En la ilustración 6, se muestra la técnica de isoinjerto de la glándula pituitaria en la cápsula de Glisson de un ratón Balb/C. Existe una base de datos del fenotipo de las cepas más comunes en el mundo disponible y elaborado por The Jackson Laboratory a través de “The Mouse Phenome Database”¹⁵. También existe una lista compilada por el Dr. Festing a través de “Mouse Genome Informatics”¹⁶ que integra un total de 420 cepas de ratones y 230

¹⁴ Imagen obtenida de: <https://bio-protocol.org/e2317>

Puede consultar la fuente directamente escaneando el siguiente código QR:



¹⁵ Puede consultar la base de datos escaneando el siguiente código QR:



¹⁶ Puede consultar la lista escaneando el siguiente código QR:

cepas de ratas descritas tales como ratones BALB/c, C57BL/6, DBA/2 y ratas como ACI, LE, F344, entre otras.

Control generacional de una cepa

Para poder mantener la consanguinidad de una línea endogámica, se recomienda implementar un sistema basado en un “núcleo reproductor”, también conocido como “foundation colony” y una o más colonias de expansión “multiplication colony”. El núcleo reproductor es lo más valioso ya que es la fuente de animales genéticamente estandarizados. Este núcleo de reproductores se conforma por 10 y hasta 20 parejas monógamas.

La integridad del genoma de una cepa puede verse alterada debido a la contaminación genética que es el problema más común de alteración genómica en colonias de reproducción endogámica alterando sus características genéticas principales. Uno de los principales factores de señal de contaminación genética de una colonia es la detección de camadas que difieran significativamente del promedio calculado para cada cepa (**De Jesús, et al. 2006**). Las principales medidas de manejo para



evitar una contaminación genética se pueden clasificar de la siguiente manera:

1. Separación física de las colonias reproductoras; particularmente las de los núcleos reproductores en cuartos separados.
2. Si la separación física no es posible, distribuir las líneas por su color de pelaje.
3. Se debe elegir un sistema de endocría que minimice el movimiento entre cajas y habitaciones de alojamiento; siendo que, las parejas monogámicas o los tríos estables son la mejor opción.

Es de vital importancia tener presente que, dentro de nuestro núcleo reproductor debe existir una “línea de ancestro principal” o de ancestro en común con la menor cantidad de ramificaciones posibles; para ello se puede utilizar los siguientes sistemas de endocría:

1. Producción en Línea única. - En este sistema, a las parejas reproductoras se les somete a un control de pureza genética; siendo el factor más importante, que todos los animales de la generación, descienda de una única pareja ancestral común por no más de 10 generaciones debido a que a partir de la filial F10, comenzará la generación de una subcepa que comparte un mismo ancestro común, pero que ha generado diferenciaciones genéticas en un *locus* determinado durante un periodo prolongado de endocría. El riesgo de utilizar una subcepa sin tener conocimiento de ello, converge en

experimentos sin reproducibilidad ni calidad en los resultados, por ejemplo: las subcepas de ratones C57BL/6J y C57BL/6N distribuidas por Jackson's Lab y Charles River respectivamente, se muestran fenotípicamente iguales, no obstante poseen un trasfondo genético diferente que puede afectar estudios con células madre hematopoyéticas debido al estrés oxidativo al cual son más vulnerables las células de los ratones C57BL/6J debido a la deficiencia del gen que codifica para la enzima nicotinamida nucleótido transhidrogenasa que funciona para eliminar las especies reactivas de oxígeno, por lo que se altera significativamente la frecuencia y función de las células madre y progenitoras hematopoyéticas de esta subcepa **(Goldstein, et al. 2018)**.

Es por ello que debe de cumplirse con obligatoriedad el monitoreo genético cuando se requiere asegurar la preservación de una determinada línea genética por largos periodos de tiempo mediante técnicas de criopreservación.¹⁷

¹⁷ Puede consultar dichas técnicas escaneando el siguiente código QR:





Esquema 1.- Endocría en línea única

El esquema 1; representa el método de endocría en línea única, el cual establece que la colonia fundadora F0 se autopetpetúa mediante el cruzamiento 1x1 h:m (hembra:macho), obteniendo 5 partos por año con las características deseables de la cepa, entre las cuales destacan: variedad de género por camada (si tienen 4 crías, deben ser 2 machos y 2 hembras), deben tener camadas con un número de crías promedio de crías (para cepas se tiene un promedio de 4 crías). Al juntar la siguiente pareja reproductiva que dará lugar a la auto perpetuidad de la colonia fundadora que consta de entre 5 y 10 parejas reproductoras para la endocría (**Benavides, 2014**), este proceso se debe realizar al destete de la 2^a, 3^a o 4^a camada y no se deben de seleccionar de la misma pareja dos veces. De esta forma se obtiene F1 de la colonia de

fundación F0 que se apareo de manera monógama 1x1 h:m. A la generación obtenida del apareamiento de F1, se le conoce como colonia de expansión o filial F2 que cuenta con las características necesarias para poder realizar cruzamiento en triada 2x1 h:m y que deben de contar con registro de pedigree fungiendo el papel de árbol genealógico (de esta manera sabemos quiénes son los ancestros comunes de la unidad reproductora). A las crías obtenidas en la colonia de expansión se les conoce como F3 que formarán la colonia para el *pool de producción* en donde se tendrán varias colonias para producir en mayor número el tamaño de la colonia mediante la implementación del cruzamiento en “ruleta” o al azar (**Sinha, et al. 2013**), esta colonia ya no lleva registro de pedigree y a la cría obtenida se le conoce como F4 que es la filial destinada al abastecimiento para su uso en la investigación. Es crucial la comprensión del manejo generacional de los animales utilizados en un experimento ya que una vez obtenida la filial F4 , no se debe seguir reproduciendo como si dicha colonia o stock fuera una F0 a partir de la F4 que utiliza el investigador, ya que después de la filial F10 de sus roedores, generará una subcepa y perderá la calidad genética de sus animales con cada generación obtenida y es una de las principales causas del sesgo en la investigación debido a la pobre confiabilidad de los resultados obtenidos en sus experimentos. Una subcepa es la rama o sublínea generada del cruzamiento endogámico de esta cepa, pero con características genéticas diferentes a las de la colonia original. A partir de la veinteava generación de cruzamientos endogámicos, obtenemos una

colonia fundadora que da origen a la filial F0 y es entonces que entre la generación F0 y la F20, existe suficiente probabilidad de que ocurra una variación genética dada por la heterocigosis residual entre generaciones que dará como resultado la formación de una subcepa completamente diferente de la cepa original a partir de la generación F10 (**Hamburg, et al. 2018**); por ejemplo: la subcepa “Steel” o 129S2/Sv de Janvier es el resultado del cruzamiento entre las cepas C3H-MgfSl-J y 129Sv por lo menos durante 12 a 14 generaciones para poder obtener un ratón de pigmentación tipo Agouti con abdomen blanco y su principal característica genética con un aumento en la incidencia de teratomas de un 10% más que las cepas de origen. Se ha demostrado que para que pueda considerarse una subcepa independiente, se necesitan por lo menos 10 generaciones de cruzamientos, sin embargo, después de la generación F20, la variación genética entre la colonia fundadora y la subcepa en cuestión está mediada por mutaciones espontáneas y deriva genética (**Wotjack, 2003**).

Generalmente las subcepas se forman al azar de manera no intencional como, por ejemplo, la contaminación genética por cruzamientos incorrectos o por falta de registros de las colonias de cepas establecidas que siguen realizando cruzamientos endogámicos más allá de la F10. La variación genética de estas subcepas se puede apreciar en su fenotipo y a menudo también es identificada por inmunólogos, ya que trabajan con sistemas muy sensibles que responden ante la más mínima variación genética de los animales utilizados para la experimentación,

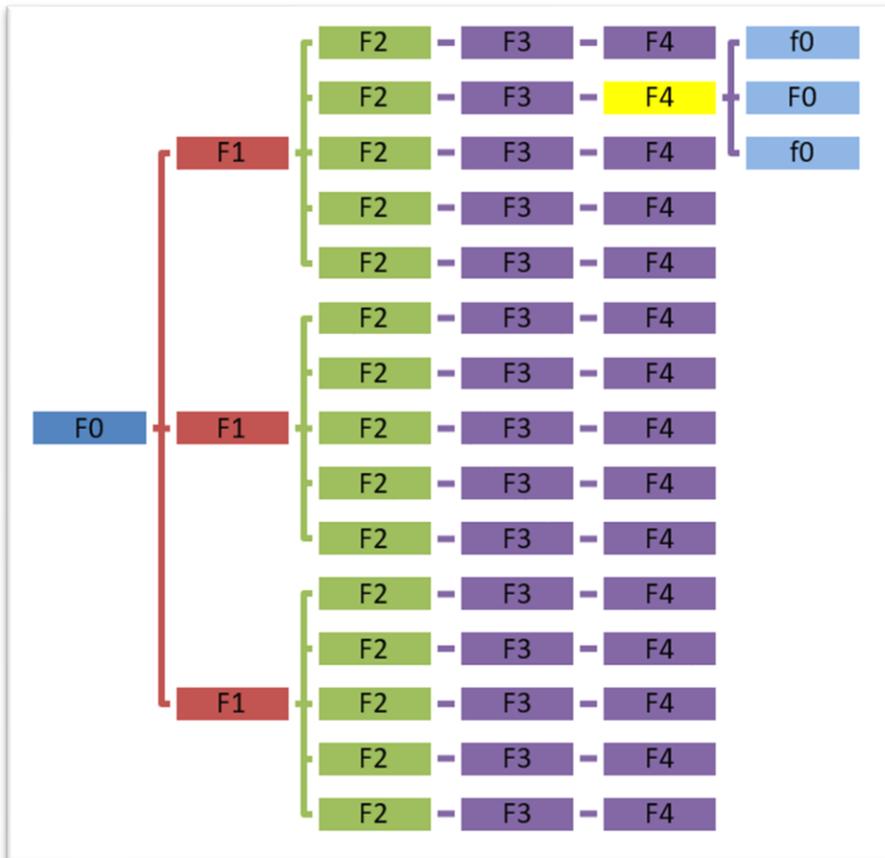
también otros ejemplos de indicadores que demuestran esta variación genética son: la respuesta de diferentes poblaciones de una cepa a las pruebas de conducta, histocompatibilidad, susceptibilidad tumoral, reactividad analgésica y anestésica, así como los umbrales de reactividad neuronal para inducir ataques epilépticos (**Yang, et al. 2003**). Aunado a la contaminación genética que puede generarse por el cruzamiento indiscriminado de una cepa, la movilización de una línea genéticamente estandarizada que se ha comprado de un proveedor certificado entre los investigadores o institutos que hacen uso de estos modelos biológicos, puede ser un acto encausado, ya que además de ser una falta a la ética profesional, viola las pólizas de compraventa establecidas por el proveedor¹⁸.

2. **Producción en Líneas paralelas o modificado**. – Se lleva a cabo mediante el mantenimiento de tres líneas en paralelo, usando entre 5 y 10 parejas por línea; 4 generaciones posteriores, se selecciona un macho y una hembra (hermanos) que serán nuestro núcleo reproductor para las próximas cuatro generaciones. A partir de este nuevo núcleo se vuelven a abrir tres líneas (tres hembras y tres machos de la misma camada) y se mantiene nuevamente por cuatro generaciones. Este sistema; ejemplificado en el esquema X,

¹⁸ Puede encontrar un ejemplo de dichas pólizas escaneando el siguiente código QR:



se basa en el supuesto de que es casi imposible que se produzca una contaminación genética en las tres líneas a la vez, siendo que la pareja seleccionada debe de pasar por un estricto control de calidad genética.



Esquema 2.- Cruzamiento en líneas paralelas.

El esquema 2 representa el sistema de cruzamiento en líneas paralelas usado para la autopropagación de un núcleo reproductor o pareja fundadora de una línea consanguínea, que, de acuerdo

con The Jackson Laboratory¹⁹; cada rectángulo representa una pareja reproductiva y todos los animales pueden ser referidos a una pareja ancestral (rectángulo azul de la generación F0). Así, se mantienen tres líneas en paralelo con cinco parejas por línea. Luego de cuatro generaciones se vuelve a elegir una pareja que será el futuro ancestro común (rectángulo amarillo de la generación F4).

Cruzamiento entre cepas

Cepas Congénicas

Las cepas congénicas se obtienen mediante el cruzamiento de dos cepas: una cepa que es la cepa donadora que tiene el alelo o *locus* de interés y la cepa recipiente o cepa de fondo que recibirá dicho *locus*. La filial F1 obtenida por este cruzamiento entre donador-recipiente, después vuelve a cruzarse con la cepa receptora. De esta forma, la descendencia que lleva el alelo de interés se identifica y de nuevo vuelve a cruzarse con la cepa de fondo; este proceso se lleva a cabo por lo menos 10 generaciones y es conocido como retrocruza o “backcrossing” mismo que se ejemplifica a continuación con la Ilustración 7 y que da como

¹⁹ Puede encontrar el manual de The Jackson’s laboratory escaneando el siguiente código QR:



resultado que los cromosomas de la cepa de fondo o recipiente, reemplacen de manera progresiva a los de la cepa donante con excepción del *locus* que lleva el alelo de interés.

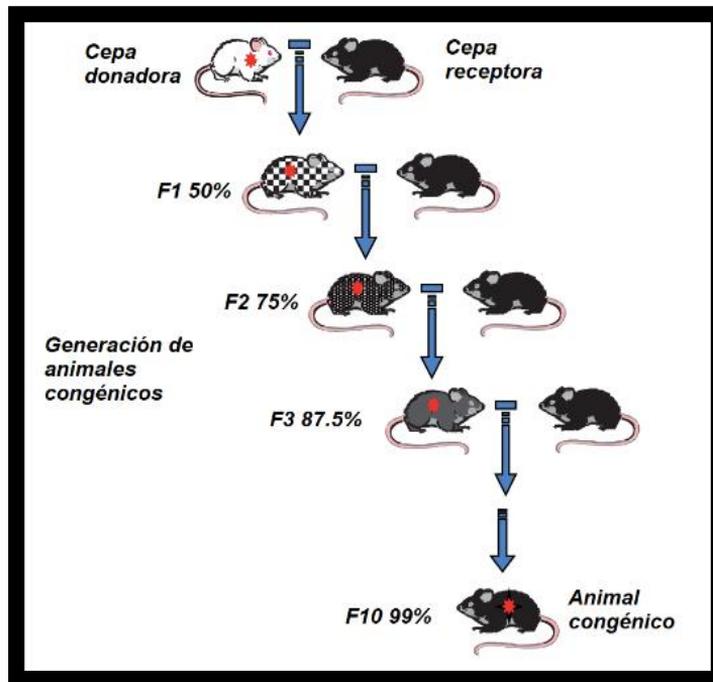


Ilustración 7.- Generación de una cepa congénica²⁰

En el anterior esquema, se representan los pasos a seguir para la producción de una cepa congénica. Primero se realiza un cruce entre la cepa donadora que lleva el alelo de interés o “target” y una cepa receptora o fondo. En cada generación, la F1 que lleva el gen de interés realiza una retrocruza con un ejemplar de la cepa

²⁰ Puede consultar la fuente directamente escaneando el siguiente código QR:



receptora; de esta forma los genes vinculados se transfieren con él a un ejemplar que no los posee). El porcentaje indica que después de cada generación de backcrossing se tendrá una mayor cantidad de genoma de la cepa de fondo, pero conservando el gen o locus target que queremos conservar a partir de la cepa donadora **(Benavides, 2019)**.

Roedores Híbridos

Existen diferentes tipos de cruzamientos entre animales endogámicos: Los híbridos F1, por ejemplo; son el resultado del cruzamiento entre dos cepas endogámicas distintas y son heterocigotos en todos los *loci* de los cuales, las cepas de los padres albergan diferentes alelos. El resultado es la obtención de las crías F1 que son isogénicas e histocompatibles **(Parikh, et al. 2019)**. La importancia de los roedores híbridos en la experimentación con animales de laboratorio recae sobre el vigor híbrido también denominado heterosis que es el término utilizado para medir el rendimiento de la descendencia obtenida por cruzamiento exogámico de dos o más cepas en comparación con el promedio parental. Este rendimiento se mide por la capacidad de la descendencia para superar diferentes características transmitidas por sus padres, por ejemplo: El número de crías nacidas vivas, días al destete, peso al nacimiento, expresión de genes para características deseables como desarrollo de tumores, entre otras **(Wakchaure, et al. 2015)**. Ratones como el B6129SF1/J, de acuerdo con The Jackson's Laboratory, pueden ser utilizados para crear o mejorar la expresión de enfermedades poligénicas, así como fungir de "buffers" fisiológicos al presentar

una gama más amplia de respuestas a diversos estímulos estresores.



Ilustración 8.- Ratón híbrido B6129SF1/J²¹

Roedores genéticamente modificados

La aplicación de la genética sobre la calidad de los roedores de laboratorio utilizados en la experimentación puede tener dos enfoques diferentes; la genética de avance o “forward” (que estudia la expresión del fenotipo a partir del genotipo), tiene por objetivo caracterizar la alteración genética responsable de un fenotipo mutante específico a partir de las mutaciones espontáneas o inducidas al genotipo, la Genética reversa o “reverse” que tiene por objetivo caracterizar la función de un gen mediante el análisis de su expresión fenotípica dadas las

²¹ Imagen obtenida de: <https://products.jax.org/101043>

Puede consultar la fuente directamente escaneando el siguiente código QR:



alteraciones en el DNA diseñadas por investigadores. De esta manera es que tenemos cinco tipos básicos de roedores genéticamente alterados **(Nagy, 2003)**:

a) Creados por microinyección pronuclear:

La inyección de pronúcleos o microinyección pronuclear es uno de los métodos mayormente empleados para producir animales transgénicos, aplicado a especies como ratones, ratas y conejos de forma exitosa. En este método, un fragmento de ADN transgénico es microinyectado al pronúcleo de un óvulo fertilizado obtenido mediante superovulación. Posteriormente, los embriones que fueron microinyectados, se transfieren a los oviductos de madres sustitutas a quienes han inducido una pseudogestación mediante el cruzamiento de la hembra fértil con un macho previamente vasectomizado **(Santos, 2004)**. El embrión se desarrolla y al nacer, el roedor albergará el gen transgénico que se le ha inyectado en su genoma. **(Chengyu, 2013)**

b) Creados por recombinación homóloga mediada por vectores virales:

La técnica de recombinación utilizando vectores virales se utiliza para introducir secuencias cortas de ADN (pocas kilobases) a través de una “infección” in vitro o in vivo de células germinales de roedores, cigotos o embriones. Se utilizan vectores de Lentivirus derivados de un virus de inmunodeficiencia humana modificado, mismo que ha resultado ser la herramienta esencial para la producción de

ratones transgénicos por este método. La recombinación homóloga con conjunto con el uso de células embrionarias se puede utilizar para crear muchos tipos de mutaciones mediante la técnica de “targeting”; entre estas mutaciones se encuentran la inactivación de *locus* conocido como “knockout” y el reemplazo de un gen con una secuencia homóloga conocido como “knockin” que lleva una mutación deseada con el fin de crear un gen nuevo **(Rulicke, 2007)**.

c) Creados en células troncales embrionarias:

Con esta técnica, la transgénesis se logra mediante la recombinación de DNA no homólogo a través de células troncales pluripotenciales. Esta técnica se ha desarrollado como forma alternativa para producir animales transgénicos de cepas endogámicas exigentes de roedores y también se utiliza por el programa europeo de mutagénesis condicional del ratón (EUCOMM) que ha creado una gran biblioteca de líneas celulares embrionarias con mutaciones en genes individuales y se encuentra en libre acceso para la comunidad científica²². La principal función de la tecnología con células embrionarias es crear mutaciones dirigidas mediante la recombinación de ADN no homólogo, método conocido como “targeting” que actualmente sólo en ratones se han podido

²² Puede encontrar la biblioteca genética escaneando el siguiente código QR:



producir células de este tipo mismas que pueden ser aisladas, cultivadas y modificadas con éxito. Es posible que la mayoría de los *loci* del genoma del ratón se puedan modificar mediante targeting de genes en células embrionarias pluripotenciales. **(Austin, 2004).**

d) Creados en núcleos de edición genética mediado por espermatozoides:

Esta técnica se basa en el uso de espermatozoides para transportar ADN del genoma al cigoto mediante una microinyección en el espermatozoide modificado, estas secuencias de integración de ADN transgénico son comparables a las de la microinyección pronuclear en cigotos de ratón.

e) Creados por mutaciones químicamente inducidas o espontáneas:

Las mutaciones espontáneas son eventos genéticos que ocurren de manera aleatoria de manera natural. Antiguamente era la única fuente de variabilidad genética en roedores y muchos han dado lugar a modelos biológicos importantes para la investigación. La mayoría de las mutaciones espontáneas pueden pasar desapercibidas debido a que no expresan para fenotipos que se puedan apreciar a simple vista, no así para las cepas, de las cuales se pueden identificar de manera más rápida mutaciones recesivas. Las mutaciones inducidas de manera química y

antiguamente de manera física tienen cada una un modo de acción distinto que induce un tipo particular de mutación. Por ejemplo, el n-etil-n-nitrosourea que induce mutaciones puntuales por metilación del ADN, este compuesto químico es utilizado en algunos países para generar roedores mutantes para el uso en la investigación **(Beal, et al. 2020)**.

Existen artículos específicos con la descripción de cada una de técnicas anteriores, sin embargo, uno de los puntos cruciales de este escrito, es el uso de los roedores transgénicos que se obtienen casi exclusivamente por el método de microinyección pronuclear y al ser ampliamente utilizados en la experimentación, convierten a este método en el más utilizado; los roedores transgénicos se crearon a principios de la década de los 80's **(Gordon, 1981)**. Entiéndase que el término de animal transgénico sólo es aplicable para los animales cuyo genoma fue modificado mediante la inserción aleatoria de ADN, a este proceso se le conoce como “Transgénesis aditiva” de una sola o un número de copias variables de un gen microinyectado aleatoriamente en el genoma del animal. Los roedores resultantes de esta técnica expresan el gen trasplantado bajo el control de promotores de crecimiento tisular o promotores de desarrollo específicos que medían su expresión durante la construcción de las cadenas del DNA transgénico.

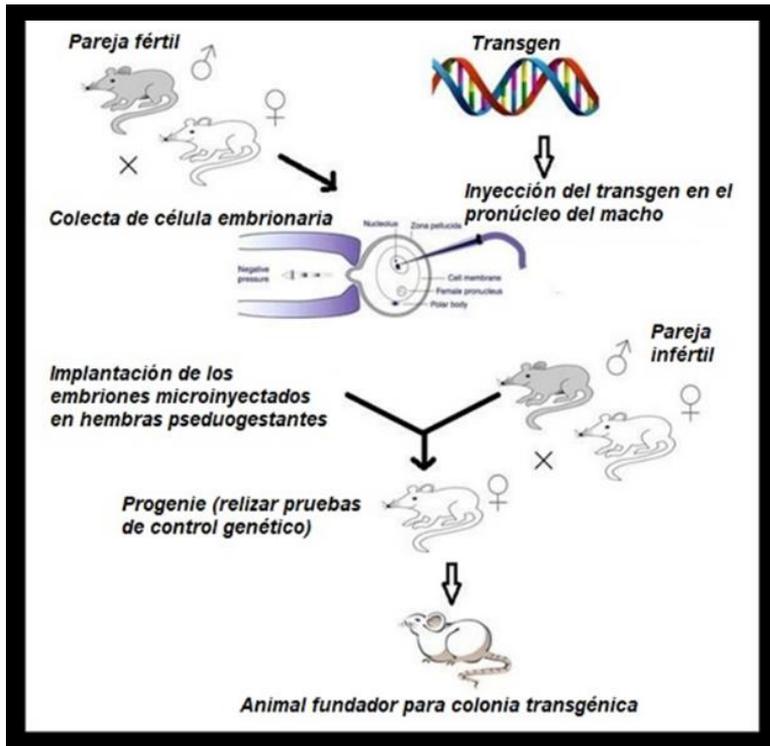


Ilustración 9.- Técnica de microinyección pronuclear para la generación de animales transgénicos²³

La nomenclatura utilizada para denotar un animal transgénico establece la abreviatura “Tg”. Los animales transgénicos fundadores son homocigotos y se designan como Tg/0. Cada línea de animal transgénico generada por microinyección de manera aleatoria crea un modelo de animal único y para lograr su progenie genéticamente estandarizada, la inyección del DNA

²³ Puede consultar la fuente directamente escaneando el siguiente código QR:



transgénico debe de realizarse en embriones obtenidos de una cepa endogámica y utilizar la técnica de Reacción cuantitativa en cadena de polimerasa en tiempo real (qPCR) para analizar la genética de la progenie **(Bellester, 2004)**.

Calidad microbiológica de los roedores de laboratorio

Los roedores utilizados en experimentación se pueden clasificar de acuerdo a su “carga” de microorganismos, a continuación, se muestra dicha clasificación y sus principales características microbiológicas:

Animales Haloxénicos

Los roedores haloxénicos o conocidos tradicionalmente como “Convencionales” de la categoría 1 por su calidad microbiológica, son aquellos roedores mantenidos sin ningún proceso especial o ambiente estéril, se albergan en instalaciones abiertas las características microbiológicas principales de un animal haloxénico consisten en estar libres de microorganismos causantes de enfermedades zoonóticas, especialmente:

- *Salmonella typhimurium*
- *Shigella flexneri*
- *Mycobacterium tuberculosis*
- *-Yersinia pseudotuberculosis*
- *Leptospira spp. (Gullace, s.f.)*
- *Trichophyton mentagrophytes*
- *Sarcoptes scabiei*
- *Virus de la coriomeningitis linfocitaria*

Animales Miroxénicos

Los roedores miroxénicos o conocidos tradicionalmente como “Convencionales limpios” que se encuentran en la categoría número 2, son aquellos roedores mantenidos bajo condiciones sanitarias estrictas y albergan una fracción inoculada de microorganismos no patógenos tomados de la microbiota de un roedor haloxénico; las características microbiológicas principales de un animal miroxénico consisten en estar libres de microorganismos incluidos en la categoría 1, además de los siguientes agentes:

- *Listeria monocytogenes*
- *Bacillus piliformis (Clostridium piliformis)*
- *Virus de Ectromelia*

Animales Gnotobióticos

Los roedores gnotobióticos, son aquellos que pertenecen a la categoría número 3 y que tienen su microbiota definida. Son comparables con animales derivados de cesárea (Axénicos) y que son inoculados con especies microbiológicas conocidas. Deben ser del mismo estatus microbiológico que la categoría número 2 y además estar libres de:

- *Bordetella bronchiseptica*
- *Pasteurella spp.*
- *Streptobacillus moniliformis*

- *Corynebacterium kuscheri*
- *Eimeria spp.*
- *Lamotheoxyuris ackerti* (MINSa, 2008)

Animales Heteroxénicos (SPF y SOPF)

Los roedores heteroxénicos pertenecientes a la categoría número 4 también son conocidos como roedores “SPF” que, por sus siglas en inglés, son aquellos animales libres de patógenos específicos. Son roedores derivados de un animal axénico o gnotobiótico que adquiere una microbiota específica por inoculación y que deben ser albergados en áreas protegidas (sistemas cerrados) en donde se mantiene un monitoreo y control sobre la calidad microbiológica del microambiente de los roedores albergados así como del control de presión atmosférica; por ejemplo, debe de haber mayor presión en el microambiente que en el macroambiente (presión positiva) debido a que esta diferencia de presiones actúan como barrera física, así como las áreas de las instalaciones que deben de contar con al menos doble puerta de acceso para aislar cualquier agente externo, entre otras características que se explicarán en el apartado de medio ambiente de este mismo escrito.

En esta misma categoría de animales Heteroxénicos, se encuentran los animales “SOPF” que, por sus siglas en inglés, son aquellos animales libres de patógenos oportunistas específicos. Ambos roedores, SPF y SOPF, deben encontrarse

bajo el mismo estatus microbiológico de la categoría 3 además de estar libres de:

- *Virus sendai*
- *Mycoplasma pulmonis*

La diferencia entre animales SPF y SOPF radica en que estos últimos deben de encontrarse también libres específicamente de los siguientes agentes oportunistas:

- *Staphylococcus aureus*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Klebsiella oxytoca*
- *Pneumocystis spp.*
- *Proteus mirabilis*
- *Streptococcus Betahemolítico (Grupos A, B, C y G)*
- *Corynebacterium bovis*

(MINSA, 2008)

Animales axénicos

Pertencientes a la categoría número 5 son también conocidos como animales “GF” que, por sus siglas en inglés, son aquellos animales libres de gérmenes, por lo tanto, no albergan ninguna

especie de virus, bacterias, hongos, parásitos ni organismos saprófitos en su organismo; es por ello que deben de mantenerse en sistemas cerrados estériles **(Zuñiga, 2016)**.

La estandarización microbiológica de los roedores de laboratorio es un aspecto fundamental que lleva un trasfondo de más de una década a nivel mundial y se ha demostrado su papel en los resultados de un experimento. Por ejemplo: Un estudio de medicina traslacional sobre la composición de las células inmunitarias en la activación de la respuesta inmune, ha demostrado que estas células en ratones silvestres se encuentran en un estado de reactividad mayor de manera innata comparado con ratones microbiológicamente estandarizados conocidos como “libres de patógenos específicos” o SPF, esto es debido a que los animales silvestres se encuentran colonizados por una microbiota de manera natural desde su nacimiento por lo que activarán una respuesta inmune poco homóloga comparada a la del humano **(Abolins, et al. 2017)**; no así en una colonia de animales SPF que en un estudio de infección con tres agentes patógenos (viral, bacteriano y parasitario) conocidos por infectar al humano, inducen patrones de reactividad celular inmunitaria bastante similares a los observados en adultos humanos **(Reese, et al. 2016)**, de tal forma que con la estandarización microbiológica de los animales utilizados experimentación en conjunto con otros aspectos de igual importancia como el tipo de albergue para animales con estas características y su correcto manejo, los resultados serán más homogéneos.

Más allá del conocimiento sobre la clasificación microbiológica de los roedores de laboratorio, es crucial la comprensión de la función que pueden desempeñar los microorganismos de los roedores de laboratorio sobre su sistema inmunitario y que debe estar presente para poder utilizarlos de manera correcta, por ejemplo: un estudio de infección en ratones con ciertos virus que desempeñan su papel como inmunomoduladores de la inflamación crónica en modelos de ratón de diabetes tipo 1, así como para mantener un número adecuado de linfocitos entéricos en los ratones **(Cadwell, 2015)**. También se ha demostrado que en ratones GF inmunodeficientes inoculados con *Candida tropicalis*, se promueve la migración de células dendríticas hacia los ganglios linfáticos del intestino, lo cual estimula el desarrollo de tejido linfoide asociado al intestino protegiendo al huésped frente a un desafío inmunológico como el de la infección con *Clostridium difficile* **(Markey, et al. 2018)**. El rol inmunomodulador de los microorganismos es uno de los pilares de la calidad microbiológica de los roedores de laboratorio, sin embargo, otro aspecto que debe comprenderse es el del alojamiento de roedores con características específicas. Por ejemplo: los animales libres de patógenos específicos deben de mantenerse en instalaciones de barrera en sistemas cerrados como se describió en este apartado, además de cumplirse siempre condiciones tales como el albergue en jaulas con microaisladores o jaulas con ventilación individual que usan filtros de aire HEPA **(Masopust, et al. 2017)** suministrando agua y alimento esterilizado, así mismo es necesario implementar un programa de

monitoreo bacteriológico de los animales que se alberguen debido a que la calidad microbiológica es concomitante al bienestar y salud animal (**FELASA, 2014**); existen tablas en donde se muestra la periodicidad y los agentes sobre los cuales se lleva a cabo el monitoreo²⁴. Estas medidas son necesarias para poder conservar el estándar de calidad microbiológica de los roedores de laboratorio y así reducir la variabilidad en los resultados de un experimento.

²⁴ Puede consultar la guía de monitoreo de FELASA escaneando el siguiente código QR:



Bioética en la experimentación con animales

La ética puede definirse como la conducta y manera de actuar del ser, quien se rige por las normas moralmente establecidas o propuestas por sus semejantes dentro de una sociedad, cultura o época en específico. La evaluación del trato del hombre hacia los animales se ha debatido públicamente desde siglos pasados **(Correa, 2009)**, sin embargo, no fue sino hasta 1971 que, basados en los trabajos de Potter, pudo definirse de manera concreta por la Real Academia de Lengua Española el término de Bioética como “la aplicación de la ética a las ciencias de la vida” **(RAE, 2020)**, por ende, los aspectos bioéticos aplicados al uso de animales de experimentación han cobrado un interés sobre la comunidad científica, filosófica y bioeticista.

Se considera aceptable el uso de animales en investigación y enseñanza solamente si contribuye de forma efectiva a la comprensión y generación de nueva información sobre principios biológicos fundamentales, así como al desarrollo de conocimiento sobre la salud humana, observando siempre por el bienestar y trato ético hacia los animales utilizados en experimentación **(ILAR, 2010)**. Definir al bienestar animal es un tema que, si no controversial, es vasto dentro de la comunidad científica, aunque lamentablemente no aplicado de manera puntual en muchos experimentos; como se describió anteriormente en el glosario y de acuerdo con la OIE, el bienestar se relaciona con las condiciones en las que el animal vive y muere. Por lo tanto, durante el periodo de vida de un animal de

laboratorio en el que es utilizado para un experimento, se considera que tiene una buena calidad de bienestar cuando se asegura el cumplimiento de aspectos tales como la prevención y tratamiento de patologías, buena nutrición, que cuente con enriquecimiento y monitoreo medio ambiental, así como de su espacio vital bien definido que es aquella área física en donde pueda moverse libremente, acicalarse, echarse y extender sus extremidades (**Brambell, 1965**). De esta manera, el intento de proveer al animal de un medio ambiente idóneo incide directamente sobre su bienestar a lo largo de su vida y esta debe finalizar de manera imprescindible, mediante la correcta aplicación del método de eutanasia para dar una muerte digna con el menor sufrimiento y angustia posible (**Broom, 1986**). La amplitud del concepto de bienestar animal comprende diferentes ámbitos como las “Cinco libertades de los animales” que dictan:

- 1.-Estar libres de sed
- 2.-Libres de hambre
- 3.-Libres de incomodidad (proveer espacio vital)
- 4.-Libres de dolor, lesiones y enfermedad.
- 5.-Libres de poder expresar comportamiento normal (implicando estar libres de miedo y distrés) (**McCulloch, 2013**).

Las libertades de expresar conducta habitual, encontrarse libres de sentir miedo y sufrir distrés van más allá de aspectos físicos como el medio ambiente o el dolor físico, se relaciona con

aspectos relacionados a la naturalidad de cada especie. En el Tratado de Amsterdam en 1997²⁵ se les otorgó el reconocimiento de “seres sintientes” por su capacidad de experimentar dolor. Sin embargo, actualmente se les debe considerar “seres sentientes” al ser capaces de sentir emociones como felicidad, placer y miedo más allá de sólo dolor (**Proctor, et al. 2013**). El reconocimiento hacia los animales por la capacidad de tener sentimientos y el progreso de la metodología experimental convergen con el refinamiento del proceso experimental junto con distintas formas y técnicas para poder evaluar de bienestar animal que implica la percepción de estímulos en ausencia de sensaciones negativas conocidas como “sufrimiento” y probablemente en presencia de sensaciones positivas denominado como “placer”. Las principales estrategias utilizadas para poder evaluar el bienestar animal se basan en el uso de indicadores, los que pueden ser directos o basados en el animal tales como la escala de Grimace que evalúa el dolor mediante la expresión facial del animal (**Whay, 2007**). También existen métodos indirectos llamados “Pruebas de preferencia”, en las cuales se presentan distintas opciones a los animales que pueden elegir y posteriormente se aplican “Pruebas de motivación” para evaluar la importancia del aspecto elegido por el animal y la incidencia sobre su bienestar (**Duncan, 2005**).

²⁵ Puede consultar el tratado escaneando el siguiente código QR:



La evaluación del bienestar animal, también se puede llevar a cabo de manera objetiva (**Broom, 2007**), sin embargo, actualmente el aspecto moral involucrado en la definición del bienestar animal, implica la siguiente pregunta “¿Hasta qué punto se considera aceptable el estado de bienestar y cuando se considera inaceptable?”, considerando no sólo estímulos nociceptivos que causen dolor físico, sino aquellas situaciones en que pudieran sufrir sed, hambre o incomodidad durante el albergue en instalaciones que no cumplen con las necesidades específicas de los animales, de tal forma que se violen una o varias de las cinco libertades de los animales. Otra forma para poder saber en que condición se encuentra el animal, es respondiendo a dos interrogantes: ¿Mejóro la salud fisiológica del animal? (Evaluado con medición de parámetros fisiológicos y conductuales), y ¿Qué resultados se obtuvieron con las pruebas de preferencia y motivación? (**Dawkins, 2008**).

El bienestar de los animales utilizados en experimentación debe ser vigilado por organismos especializados en el área; en México, la experimentación con el uso de modelos animales es regulada por comités de bioética como el SICUA de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia en la UNAM, en donde los miembros revisan la metodología experimental utilizada en las investigaciones que requieren modelos animales para su aprobación con base en el principio de las “Tres erres” considerando siempre el siguiente principio: “los experimentos con animales sólo deberían ser realizados cuando no hay otra alternativa y cuando los beneficios de este son tales que se

justifica el sufrimiento animal” (OIE, 2008). Las investigaciones etológicas sobre las especies animales utilizadas por el hombre para su propio beneficio, pueden entregar valiosas evidencias científicas sobre las cuales se pueden basar regulaciones legislativas y reglamentos, La Organización Mundial de Salud Animal (OIE) es la institución líder en el campo del bienestar animal, decretando estándares internacionales de bienestar animal y que con base ello, se regula el uso de animales en México aplicado para cada especie con sus medidas particulares para conservar una calidad aceptable de bienestar animal durante la experimentación.

Para poder garantizar el cumplimiento de los principios de las “tres erres”, los países que integran a la Unión Europea tienen obligación de entregar reportes anuales sobre el uso de animales en experimentos, justificaciones y el nivel de invasividad de los procedimientos que lleven a cabo.

Las tres R’s en la experimentación con animales

En 1959, fueron establecidos en la obra escrita de Russell y Burch (zoólogo y microbiólogo respectivamente), los principios de las “tres erres” para el uso de animales de experimentación en “The Principles of Humane Experimental Technique”, estableciendo los siguientes principios:

1. Reemplazo.- al sustituir de manera parcial o en su totalidad el uso de animales.

2. Refinamiento.- al disminuir la severidad de los procedimientos experimentales que utilizan animales.
3. Reducción.- al minimizar el número de animales que se utilicen por experimento.

Un experimento será éticamente aceptable y correcto cuando se cumplan con estas tres R's que, a pesar de ser principios difundidos y aceptados internacionalmente, el uso y manejo de los animales varía en cada región o país e incluso entre cada institución, por lo que podría considerarse utópico el cumplimiento puntual de las buenas prácticas que observen por el bienestar de los animales durante un experimento bajo estos principios a pesar de su obligatoriedad. Esa responsabilidad recae sobre el investigador, operarios y terceros que apoyan en un experimento o estudio, así como de quienes recurren al uso de estos seres sentientes para la docencia. Por lo tanto, se debe observar por su bienestar en todo momento para poder obtener resultados con información válida y reproducible basada en un trato digno y humanitario hacia los animales.



Ilustración 10.- Russell y Burch²⁶

El zoólogo y William Moy Stratton Russell y el microbiólogo Rex Leonard Burch; autores del libro Principios de la técnica experimental humanitaria.

Punto final humanitario

El punto final humanitario puede definirse como aquel indicador más temprano de posible dolor, sufrimiento o agonía que este último se refiere al estado extremo de sufrimiento en un ser vivo

²⁶ Imagen obtenida de: <https://en.3rcenter.dk/3r/russell-burch/>
Puede consultar la fuente directamente escaneando el siguiente código QR:



que, aplicado a los roedores utilizados en experimentación, se debe utilizar para evitar o limitar dicho estado de sufrimiento mediante la implementación de medidas tales como la eutanasia. Existen cinco tipos de punto final humanitario (**Morton, 2005**): el primero está dado cuando el animal no va a proporcionar más información científica representativa debido a sus afecciones fisiológicas y afecten la confiabilidad de los resultados del estudio o experimento. Por ejemplo; si un animal desarrolla una diarrea aguda necrosante durante un experimento y por ello se convierte en un animal metabólicamente inestable provocando que la obtención de datos fisiológicos de dicho animal no sea confiable.

El segundo tipo de punto final se refiere a cuando el animal no va a proporcionar información científicamente útil porque se encuentra en un estado de distrés que puede provocar una alteración en su sistema inmunológico que provocará en el animal un estado de inmunodepresión y alteración fisiológica. Por ejemplo; de un animal que se encuentra bajo estrés durante una administración y presenta vocalizaciones, alertará al resto de animales en la sala o habitación mediante comunicación conoespecífica induciendo un estado de alerta dado por el aumento exponencial de niveles de cortisol y si este proceso se realiza de manera periódica provocando ese estado de distrés en los animales, los parámetros fisiológicos e inmunológicos se verán afectados de manera negativa, disminuyendo la brecha de confiabilidad en nuestros resultados (**Navarro, 2019**).

El tercer tipo de punto final debe aplicarse cuando el sufrimiento causado a los animales durante el estudio es mayor a lo previsto y la relación del sufrimiento/beneficio del experimento se pierde debido a que el daño causado al animal es mayor que el beneficio de los resultados del experimento que se buscan en ese momento.

El cuarto tipo de punto final se aplica cuando el nivel de sufrimiento del animal es tan alto que simplemente es antiético seguir causando ese grado de daño al animal, por ejemplo: estudios para evaluar mecanismos neurológicos asociados a estímulos nociceptivos, al rebasar el umbral del dolor del animal y provocar un estado de agonía, también se denota como “Daño severo y angustia severa” (OCDE, 2000).

El quinto tipo de punto final, cuando un alto grado de sufrimiento puede justificarse, pero no existe la necesidad de causarlo ya que puede preverse y aplicar el punto final científico una vez obtenidos los resultados representativos del experimento. Por ejemplo; en pruebas de categorización de sustancias tóxicas en donde se obtenga el primer animal positivo se debe aplicar el punto final humanitario incluso si el resto de los animales dieran negativo siendo imprescindible un diseño experimental correcto que refine y reduzca el número de animales sin afectar la calidad de los resultados de nuestro experimento (Morton, 2005).

Reconocimiento y evaluación del dolor en los animales

El término de evaluación de la severidad abarca de manera más específica la categorización de los estados fisiológicos afectados de manera negativa durante el proceso experimental, es por ello que tanto la promoción del bienestar animal como la evaluación de la severidad tienen un mismo objetivo; el reconocimiento de cualquier semiología relacionada al dolor, sufrimiento o angustia resaltando su importancia para aliviar la carga nociceptiva durante el proceso y promover el refinamiento de los mismos para mejorar la calidad de los resultados obtenidos. Concomitante con la detección oportuna de la semiología del dolor en el modelo *in vivo*, se encuentra el nivel de invasividad del procedimiento experimental al que se les somete, este se puede clasificar en 5 grupos de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999 y el Consejo Canadiense del Cuidado Animal (**CCCA, 1991**).

- Grupo A.- Experimentos sin invasividad y que utilizan modelos como protozoarios u otros organismos unicelulares, así como de cultivos celulares u órganos obtenidos *post mortem*.
- Grupo B.- Experimentos de invasividad mínima y que causan un nivel de estrés y dolor de muy corta duración. Por ejemplo; el aislamiento momentáneo (el intervalo de tiempo necesario para su observación) en un estudio de

conducta, toma de muestra sanguínea y administración de sustancias vía intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal y oral.

- Grupo C.- Procedimientos con un nivel de invasividad leve que causan un estrés o dolor de corta duración. Por ejemplo; cateterización de vasos sanguíneos o biopsias (con el animal en plano anestésico) así como de abstinencia de alimento y agua por un breve periodo de tiempo sin generar en la animal semiología de estrés crónico (anorexia, automutilación, hiperreactividad, entre otros), alteraciones en sus parámetros fisiológicos como taquicardia o taquipnea ni cambios conductuales como asilamiento y retracción social.
- Grupo D.- Procedimientos con un nivel de invasividad medio y que causan estrés o dolor moderado a severo tales como cirugías mayores bajo anestesia, aislamiento para su observación prolongada (desde horas y hasta varios días) así como de procedimientos que causan alteraciones sensoriomotoras severas o incluso irreversibles mediante la administración de sustancias.
- Grupo E.- Procedimientos con un alto nivel de invasividad y que causan dolor severo pudiendo superar el umbral de tolerancia del animal. Por ejemplo; la administración de

paralizantes musculares y provocación de traumas o quemaduras en el animal sin encontrarse en plano anestésico, así como de pruebas de toxicidad e infecciones inducidas en experimentos cuya finalización resulte en la aplicación de eutanasia al modelo biológico.

Para poder reconocer la semiología de un animal que está sufriendo dolor y angustia, es imperativo que quien evalúa su condición esté familiarizado con las características y parámetros basales de la especie en cuestión. Entendiendo de esta manera al modelo animal utilizado en el estudio en donde la respuesta de un animal a una sustancia de ensayo es el resultado de la interacción de la sustancia con su organismo que pueden producir en ellos, efectos adversos expresados como signos clínicos dados por cambios fisiológicos debido a la toxicidad de la sustancia empleada (**OCDE, 2000**). La Justificación del uso de puntos de finalización humanitaria utilizando esta información dada por los signos clínicos como base, se encuentra en la capacidad para ser aplicados de manera precisa y oportuna por parte del investigador sin afectar de negativa los resultados de nuestro experimento llevando a cabo una investigación de calidad basada en el bienestar animal.

La observación y examinación periódica de los animales utilizados en un experimento es esencial para la detección de semiología del dolor; la observación debe realizarse de manera diaria y la examinación debe realizarse de manera semanal de forma más detallada una vez que se ha observado un signo

clínico ante la inspección diaria. Una vez detectado el signo clínico de dolor se debe documentar incluyendo cuando inició, su duración y severidad para poder determinar la gravedad del dolor y que acciones tomar.

Existen una serie de cambios fisiológicos involucrados en la evaluación adecuada de un animal para determinar su condición y si podría haber evidencia indicativa de dolor o angustia. Existen escalas de para evaluar de manera rápida la presencia e intensidad del dolor en los animales basadas en la inspección visual como la escala de Grimace que se emplea para determinar el grado de dolor por medio de gestos faciales de los animales (entrecierre de los párpados, aplanamiento del plano nasal y mejillas, posición de las orejas y la posición de las vibrisas) a continuación se muestra dicha escala aplicada en ratas:



Ilustración 11.-Escala de Grimace en ratas²⁷

²⁷ Puede consultar la fuente directamente escaneando el siguiente código QR:



La escala de Grimace se aplica a diferentes especies²⁸ y cuenta con una guía escrita que puede servir como referencia para poder realizar la medición del dolor en los animales. Herramientas como la escala de Grimace son esenciales para la evaluación del dolor en los animales, sin embargo, es de vital importancia siempre considerar además las diferentes variables que sirven como indicadores de dolor en los animales, tales como:

1. Cambios físicos: Pelaje hirsuto, presencia de orina y heces en pelaje, emaciación progresiva; la pérdida significativa de peso corporal puede ser uno de los indicadores más sensibles para determinar que la condición de un animal se está deteriorando debido a que el estado de emaciación va acompañado de un cambio en el consumo de alimento y agua que también debe ser vigilado por el personal encargado de los animales. Existe la posibilidad de la presencia de dolor y angustia en animales jóvenes que no han alcanzado su peso promedio en la edad adulta en comparación con un animal de grupo control que si ha alcanzado su peso promedio en la adultez.

²⁸ Puede encontrar la escala de Grimace para las diferentes especies escaneando el siguiente código QR:



2. Cambios en las frecuencias basales: disnea, taquicardia o bradicardia por postración, temperatura corporal; la hipotermia y la hipertermia pueden servir como indicadores importantes del deterioro de la calidad del bienestar de un animal. Por ejemplo, en estudios que han documentado una baja de al menos el 10% en la temperatura corporal, se ha presentado muerte inminente de los animales. Por lo tanto, es un parámetro fisiológico que debería monitorearse de manera no invasiva por medio de termómetros infrarrojos para evaluar periódicamente las disminuciones específicas en la temperatura debido a que la hipertermia e hipotermia pueden ser efectos transitorios de la sustancia administrada a los animales de nuestro experimento o bien un indicador de punto final humanitario.
3. Cambios en la conducta: hiperreactividad ante estímulos externos, automutilación, canibalismo, adipsia y anorexia. El hábito nocturno de los roedores de laboratorio dificulta la tarea de la observación de conductas habituales diariamente, sin embargo, la observación diurna de patrones de horas de sueño puede ser indicativo de ausencia de dolor o de malestar, se debe de tener en cuenta la apariencia, la postura y patrones de acicalamiento durante las horas de sueño de los animales.

Estos signos se utilizan para determinar si la condición del animal es irreversible, de tal forma que, la acción pertinente es llevar a cabo la aplicación de eutanasia al animal. En el estudio *post mortem* se podrá relacionar el hallazgo de lesiones con los signos

clínicos que haya presentado el animal. De esta manera, el monitoreo, examinación (que incluye el estudio *post mortem*) y muestras clínicas son esenciales para estudios que utilizan un modelo biológico. Por ejemplo; estudios de toxicología en los que se deben de considerar las siguientes directrices y que también son aplicables para todo tipo de estudio:

- Realizar observación y examinación clínica periódica para la detección de signos y condiciones anormales al estado basal del animal y que sean indicativos de dolor de acuerdo con la severidad del procedimiento. A continuación, se ejemplifica con una tabla el grado de sensibilidad al dolor por región anatómica del roedor de laboratorio:

Región anatómica	Sensibilidad leve	Sensibilidad moderada	Sensibilidad alta
Vísceras	X	X	
Músculos	X	X	
Articulaciones	X	X	
Huesos	X	X	
Médula espinal		X	X
Piel		X	X
Perostio		X	X
Vasos sanguíneos		X	X
Ojos, oídos, dientes			X
Genitales			X

Tabla 1.- Grado de sensibilidad al dolor por región anatómica del roedor de laboratorio²⁹

²⁹ Puede consultar la tabla de referencia escaneando el siguiente código QR:



- Determinar la severidad de los procedimientos y de los signos indicativos de dolor en los animales examinados para poder aplicar el punto final humanitario de manera oportuna. A continuación, se ejemplifican algunos procedimientos y su grado de severidad:

Severidad	Procedimiento
Baja	-Obtención de muestras sanguíneas -Exploración rectal -Frotis vaginal -Radiografías -Administración oral de sustancias inocuas -Inmunización sin adyuvante -Experimentos terminales bajo plano anestésico
Media	-Muestreo sanguíneo repetitivo -Test de pirógenos -Recuperación postquirúrgica -Inmunización con adyuvante incompleto -Inmovilización -Canalización y cateterización
Alta	-Paracentesis -Privación de agua, alimento o sueño -Inducción tumoral -Estimulación nociceptiva -Pruebas en estudios de DL50 -Inmunización con adyuvante completo

Tabla 2.- Grado de severidad por procedimiento³⁰

- Establecer la relación entre la obtención de datos y el sufrimiento animal por parte del director del estudio para poder determinar el momento oportuno de la aplicación del punto final humanitario.

³⁰ Puede consultar la tabla de referencia escaneando el siguiente código QR:



- Determinar cuando los signos hallados sean indicativos de una condición irreversible. Por ejemplo; la condición de un animal moribundo dada por signos como emaciación grave (pérdida de peso de más del 20%) dada por disfagia y adipsia para poder aplicar de manera oportuna la eutanasia a dicho animal. A continuación, se muestra una hoja de registro que sirve como guía para determinar el punto final humanitario y la frecuencia con que se deben monitorear estos signos.

Variable	Observaciones	Puntuación	Periodicidad
Peso corporal	• Sin pérdida de peso	0	Diario
	• Pérdida de peso menor al 10%	1	
	• Pérdida de peso entre el 10 y 20% con posible disminución en la ingesta de alimento	3	
	• Pérdida de peso mayor al 20%. El animal no consume agua ni alimento	4	
Aspecto locomoción y	• Postura erguida, pelaje lustroso y se muestra móvil	0	Diario
	• Poca movilidad, posible cromodacriorrea, pelaje hirsuto	1	
	• Inmóvil, postura encorvada, aislado, cromodacriorrea, pelaje hirsuto	2	
	• Postración en decúbito lateral, ojos hundidos	3	
Reactividad	• Se muestra atento a estímulos, interactúa y se acicala	0	Diario
	• Muestra movimientos respiratorios rápidos, se aísla en el fondo de la caja, poco acicalamiento	1	
	• Poca actividad, aislado, respiración abdominal	3	
	• Animal inmóvil, postración en decúbito lateral, abre la boca al respirar	4	
Parámetros fisiológicos	• Sin alteración	0	Diario
	• Ligero aumento en frecuencia cardíaca y respiratoria (no más del 10%)	1	
	• Incremento de la temperatura corporal en 1-2°C e incremento en un 30% de las frecuencias cardíaca y/o respiratoria	2	
	• Incremento de la temperatura corporal en más de 1-2°C e incremento en un 50% de las frecuencias cardíaca (310-840 lpm) y/o respiratoria (60-220 rpm)	3	

Tabla 3.- Puntuación para determinar la aplicación del punto final humanitario³¹

³¹ Puede consultar la tabla de referencia escaneando el siguiente código QR:



Con base en la lista anterior, la puntuación para determinar el punto final humanitario va de 0 a 9 puntos, siendo que cuando el animal obtiene una puntuación de 3 en más de un parámetro evaluado, todos los 3 pasan a tener un valor de 4 puntos y se procederá a tomar las siguientes medidas correctivas de acuerdo con la puntuación obtenida:

1. De 0 a 3: normal sin medidas correctivas.
2. De 4 a 6: supervisar cuidadosamente con posible administración de analgésicos.
3. De 7 a 9: sufrimiento intenso, se deben administrar analgésicos y considerar la opción de efectuar eutanasia.
4. De 10 a 12: agonía, se debe aplicar eutanasia al animal y considerar parar el experimento.

De acuerdo con la **CONICYT, 2009**; la puntuación de 8 a 12 es un indicador de deterioro significativo que va del sufrimiento intenso a la agonía del animal, esto lo convierte en candidato para la aplicación de eutanasia; se sugiere que sea mediante sobredosis anestésica o en cámara de CO₂. Las anteriores tablas para evaluación del dolor y registro para el punto final humanitario son guías imprescindibles para el bienestar de los animales, sin embargo, se puede determinar con antelación la aplicación de eutanasia sin tener que llegar a una puntuación de 8 a 12 en la escala; se debe tener en cuenta siempre por medio de analogía, el criterio suficiente para saber cuando terminar con el sufrimiento de un animal, sobre todo cuando existe evidencia de que el experimento causa dolor y sufrimiento desde la elaboración de su

protocolo. El uso de estas escalas ayudará a sintetizar la información obtenida del monitoreo periódico de los animales, así como mejorará las habilidades de observación y capacidad de discriminar entre indicadores de punto final humanitario y semiología dada por efectos del tratamiento en el experimento. La periodicidad de la observación debe efectuarse por el responsable del proyecto, se sugiere que se realice después de la administración del producto en los animales, especialmente durante las primeras 24 horas cada 30 minutos, posteriormente el monitoreo debe ser diario incluyendo en la lista la determinación de un estado normal o anormal y la gravedad de los signos clínicos observados con la finalidad de aplicar de manera oportuna y preferentemente anticipada, el punto final humanitario.

Medio ambiente y su relevancia en un experimento

Los roedores de laboratorio son el insumo principal del proceso experimental. Son utilizados como reactivos biológicos para investigar y comprender las causas, diagnóstico y tratamiento de enfermedades al humano y otras especies, así como en el desarrollo y control de medicamentos, es por ello que se requiere que la producción de animales genéticamente estandarizados y microbiológicamente certificados, se lleve a cabo con sus requerimientos medioambientales específicos, ya que de lo contrario no podremos obtener resultados válidos que reflejen realmente el mecanismo de acción, toxicidad o eficacia del producto que se está poniendo a prueba. Es por ello que el manejo medioambiental para estos animales con necesidades específicas se debe llevar a cabo de manera adecuada. El ambiente físico que interactúa con los animales de laboratorio comprende las instalaciones en donde se realizan procedimientos de manejo, así como de su alojamiento. Las principales variables medioambientales físicas con las que los animales interactúan durante el proceso experimental son: iluminación, temperatura, ruido y humedad. Sin embargo, no sólo consiste en un medio físico externo que los rodea, también interactúan con ellos un amplio rango de estímulos como el ambiente social interespecífico del cual, el ser humano forma parte, así como de las instalaciones antes mencionadas (**Andersen, et al. 2016**).

El ambiente físico que rodea a nuestros animales se divide en microambiente y macroambiente, siendo que el microambiente se conforma por el primer medio físico e inmediato que interactúa de manera directa con los animales o unidades experimentales; por ejemplo: la caja en donde se alberga un roedor o el corral de un cerdo. El macroambiente comprende al ambiente físico externo al microambiente que no se encuentra en contacto directo con el animal durante su alojamiento y que sólo interactúa con él cuando es trasladado para realizar procedimientos (como toma de muestras) durante un experimento si así se requiere debido al diseño de instalaciones, por el tamaño de los animales o si así lo indica el protocolo; por ejemplo: la sala de experimentación en donde se encuentran las cajas de los ratones, la pira de un conjunto de cerdos, el establo de un conjunto de caballos.

El control del ambiente de los animales tiene un impacto imprescindible en el bienestar animal a lo largo de su vida desde su recepción en las instalaciones y hasta el término del experimento. De tal forma que, se debe de considerar el siguiente equipo de control medio ambiental para albergar a las distintas especies utilizadas en experimentación. El sistema HVAC (Heating Ventilation and Air Conditioning System) es el equipo encargado de controlar los recambios de aire, temperatura y humedad en el macroambiente de los animales albergados en salas de experimentación animal. En la siguiente tabla, se anotan los parámetros medioambientales necesarios para mantener una calidad de bienestar aceptable de los animales albergados en instalaciones destinadas a la experimentación (**Navarro, 2019**).

Especie	Temperatura	Humedad relativa	Iluminación (luxes)	Ruido (decibeles)	Recambios de aire/ hora
Ratas	20-24 °C	40-70 %	<325 lx	60 db	10-20
Ratones	20-24 °C	40-70 %	<325 lx	60 db	10-20

Tabla 4.- Parámetros medioambientales para roedores de laboratorio.³²

Estos valores ayudarán a conservar un estado aceptable de bienestar en los animales dado que, existen aspectos de los parámetros ambientales que influyen de forma importante en el bienestar animal, tales como: el límite máximo de intensidad luminosa en roedores de laboratorio que se ubica en los 325 luxes que se justifica por la posible presentación patológica de retinopatía fototóxica que afecta especialmente a animales albinos al superar el límite de intensidad luminosa descrito, el factor desencadenante de esta patología y la presentación de semiología por estrés; son las horas de exposición de luz:oscuridad. Para garantizar una buena calidad de bienestar animal se ha demostrado que un intervalo de 14:10 horas luz:oscuridad en roedores de laboratorio (**Neil, 2003**), contribuye a que desarrollen conductas habituales y evita el estrés en los animales; asimismo, existen estudios previos que demuestran que bajo condiciones de intensidad de 325 luxes (intensidad a la

³² Puede consultar la fuente directamente escaneando el siguiente código QR:



cual los operarios realizan habitualmente sus actividades diarias), puede ocasionar estrés en los animales que si se mantiene de forma sostenida, provocará alteraciones fisiológicas como pelecha, arritmias, disminución en la ingesta, peleas, cromodacriorrea, entre otras; no así bajo condiciones con 10 luxes de intensidad luminosa como máximo, misma que reduce el estrés en los animales así como la semiología correspondiente **(Azar, 2008)**, sin embargo, la intensidad luminosa de 10 luxes resulta inapropiada para el desempeño de las tareas por parte de los operarios, por lo que se puede inferir que una intensidad de 210 luxes es el límite ideal para la realización de procedimientos dentro de una habitación que albergue roedores de laboratorio y lagomorfos con zonas donde puedan resguardarse de la exposición a dicha intensidad luminosa, pudiendo colocar piezas de acrílico opaco sobre las cajas de los animales **(Navarro, 2019)**.

La variable medioambiental de ventilación observa la calidad del bienestar animal al eliminar partículas nocivas y agentes etiológicos al recircular el aire del lugar en donde se albergan los animales un número determinado de veces que debe de circular a través de filtros especiales "HEPA". Sin embargo, estos recambios que inciden directamente sobre la ventilación del macroambiente no necesariamente aseguran una adecuada ventilación de la primera barrera física del animal (microambiente), de esta forma, el tipo de caja, establo o jaula influye considerablemente sobre la ventilación entre estos dos ambientes **(ILAR, 2010)**. El promedio de recambios de aire por hora de la NOM-062-ZOO-1993, establece un intervalo de entre

10 y 20 recambios de aire por hora, sin embargo, la justificación para el cálculo de recambios de aire por hora en el lugar en donde se albergan los animales puede variar dado el volumen de la sala, la cantidad de cajas o la densidad poblacional, una forma en que se puede calcular es de la siguiente manera: se obtiene el valor del gasto de ventilación al medir el área de la superficie donde se encuentran los animales (m²) y multiplicando por la constante de inyección mínima de aire (1 cfm/ft²) se multiplica por 60 y por último, ambos se dividen entre el volumen de la sala que se expresa en pies cúbicos (**Airistar Technologies, 2005**).

Siendo así:

$$x = \frac{CFM \times 60 \text{ minutos}}{(L \times H \times A)}$$

Este método de cálculo de recambios de aire puede ser utilizado para todas las especies, mismo que se justifica para la mayoría de las instalaciones donde se albergan animales y que conservarán una calidad de bienestar aceptable. La variable medioambiental que acompaña de cerca a la ventilación, es el ruido, de acuerdo con **Fox, 2007**; es la producción de sonido por encima de los límites que puede dañar la salud, mismo al que se exponen los animales debido a que los sistemas de extracción e

inyección de aire producen ruido constante, la NOM-062-ZOO-1999 establece como límite máximo 85 db de intensidad sonora a la que se puede exponer un animal de laboratorio, sin embargo, existen estudios que estipulan un máximo de 60 db para conservar un estado aceptable de bienestar en los animales albergados para un experimento **(Blanes, et al. 2010)**, además de este valor, debe de considerarse que el material utilizado para albergar a los animales es un factor que influye notablemente en la captación del ruido al interior de la caja o jaula donde se encuentren; siendo que, se ha demostrado que en el interior de una caja de policarbonato se puede aislar hasta 10 db comparado con la intensidad sonora percibida en cajas con rejillas de metal **(Voipio, et al. 2006)**. Otro factor que influye sobre la captación de ruido y el bienestar animal, es el tipo de ruido percibido debido a que existen dos tipos: el ruido agudo o inestable que se refiere a un sonido súbito que tiende a variar en más de 5 db al ser percibido como el sonido de una sirena, la caída de material metálico y pesado al suelo o el ruido de maquinaria que al ser percibido por los animales y por medio de comunicación conespecífica, alertarán al resto de los animales en el área donde residen provocando un estado de estrés que, por ejemplo: al estar en una sala de procedimientos durante una toma de muestra de sangre, se pueden ver alterados valores específicos en el hemograma y bioquímica sanguínea perdiendo así la validez de nuestros resultados. El ruido crónico o estable es aquel que no rebasa los 5 db de variación en el transcurso de un minuto, por ejemplo: el sonido del sistema de ventilación, la caminata de los

operarios o el abrir y cerrar de las puertas. Hay ruidos que se consideran preferibles unos de otros, por ejemplo: el ruido generado por el sistema de ventilación puede aislar o “enmascarar” otros ruidos que pueden resultar estresantes para los animales, estos a su vez, pueden ser desensibilizados mediante la exposición gradual a ruidos extraños con un incremento de volumen mediante el refuerzo positivo de la asociación a sonidos específicos produciendo experiencias placenteras que en otras circunstancias sean estresantes **(Patterson, et al. 2006)**.

La temperatura puede definirse como el potencial o grado calorífico referido a un cuerpo, siendo que el rango de temperatura medio ambiental en la que un animal puede mantener su temperatura corporal basal (36.5-38°C en ratones y 37.5-38.5°C en ratas) sin la necesidad de recurrir a mecanismos de homeostasis, es llamado “Zona termoneutral”; la NOM-062-ZOO-1999 estipula un rango de entre 18-26°C, sin embargo, estudios demuestran que para alcanzar esta zona termoneutral, basta con una temperatura medio ambiental dentro de un rango de entre 24-29°C **(Krinke, et al. 2000)**. Por el contrario, cuando la temperatura disminuye a un valor menor de 15°C, los animales se encontrarán mayormente vulnerables debido a que los cilios del aparato respiratorio se paralizan, impidiendo la función de barrera física ante microorganismos patógenos, así como del aumento de su gasto calórico con el fin de generar calor por medio de mecanismos como la glucólisis y glucogenólisis; estos intentos por intentar sobrellevar el medio ambiente que los rodea de

manera sostenida, llevará a los animales a un estado de distrés que posteriormente producirá un estado de inmunodepresión (**Gaskill, et al. 2017**). La variable medioambiental que se relaciona mayormente con la temperatura es la humedad relativa, que puede definirse como la relación entre el contenido de vapor de agua que se encuentra en una masa de gas y su saturación máxima a una temperatura y presión específicas. Los parámetros establecidos para conservar una buena calidad de bienestar animal son de 40-70% de humedad relativa y 18-24°C de temperatura ya que se ha demostrado que cuando no se cumple con estos valores, dan lugar a un estado de distrés por intento de adaptación al medio ambiente sostenido por medio de mecanismos de homeostasis, por ejemplo: cuando la humedad relativa es menor de 40% y la temperatura ambiental comienza a subir, ocurre un aumento del flujo sanguíneo en regiones específicas como las orejas en donde se encuentran vénulas y arteriolas anastomosadas para poder disipar calor fácilmente, de igual manera ocurre en la región interdigital y el hocico que funcionan como “ventanas” para disipar calor; por el contrario, si la humedad relativa es mayor al 70%, intervienen mecanismos de pérdida calorífica como la postración sobre superficies frescas para perder calor por conducción, también comenzarán a aumentar su frecuencia respiratoria y cardíaca debido a que la humedad relativa alta no permite la suficiente evaporación para poder perder calor de manera rápida.

Una de las patologías relacionadas a la humedad relativa baja, es la cola anillada, que se presenta en cualquier etapa de la vida de

los animales pero principalmente en crías de ratas y ratones desde una semana de vida cuando se presenta una humedad entre 24-40% aunado al tipo de cama que si es del tipo higroscópico (absorbe demasiada humedad), provoca enfriamiento por evaporación de la rata recién nacida desnuda, lo que lleva a una vasoconstricción sostenida en un intento por reducir la pérdida de calor, este aumento del flujo sanguíneo turbulento y vasoconstricción sostenida, causa trombosis y finalmente necrosis isquémica de la cola (**Recordati, et al. 2014**). De manera contraria, si se supera el 70% de humedad relativa, aumenta la virulencia de ciertos virus por diseminación aérea como el virus Sendai (**Gerald, et al. 2006**).

Los valores y rangos antes descritos en este apartado deben cumplirse bajo el criterio necesario como para poder comprender que el modelo biológico utilizado puede o no adaptarse de una forma necesariamente estricta a los parámetros de las variables medioambientales establecidas, menester que sean implementadas las medidas necesarias y ser monitoreadas de manera periódica para conservar la calidad de bienestar óptima de nuestros animales.

Conclusiones

Las directrices conjuntas en este escrito compendian los puntos críticos para llevar a cabo un proceso experimental de calidad, basadas en material bibliográfico de impacto dentro de la comunidad científica internacional. Otorga la herramienta necesaria para enriquecer el pensamiento crítico sobre el uso del método *in vivo* en la experimentación y así, que el investigador, docente o alumno que desee llevar a cabo un experimento o estudio en donde no pueda prescindir del modelo biológico, tenga un fácil acceso a estas pautas y cumpla con obligatoriedad la observancia en todo momento del estándar de calidad, el bienestar y trato humanitario de los seres sentientes que son utilizados como insumo principal; concomitantes de la validez, reproducibilidad y trazabilidad de los resultados obtenidos en un experimento. Es así, que el proceso experimental se lleva a cabo de manera integral y es orientado por un camino de carácter más ético e innovador.

“Yo siento los sufrimientos de los animales tan intensamente que nunca me he dedicado a la caza o al deporte del tiro. El alarido de una alondra me llegaría al alma, pero cuando hemos de investigar los misterios de la vida o conseguir nuevas verdades, la soberanía del propósito se antepone”. ***Louis Pasteur.***

Referencias

- Romero, *et al.*, (2016). El 1, 2, 3 de la experimentación con animales de laboratorio. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 33(2), pp. 288-99.
- Hernández, *et al.*, (2014). *Metodología de la investigación*. 6a ed. México, D.F: McGraw-Hill, p. 129.
- OIE, (2021). Código sanitario para los animales terrestres, 1(7),pp. 1-2.
- Oyarzún, (2017). Medicina traslacional: un puente de plata entre las ciencias básicas y la medicina clínica. *Revista chilena de enfermedades respiratorias*, 33(2), pp. 81-84.
- Velasco, (2020). Reproducibilidad y repetibilidad entre filósofos y científicos. *Jornadas de epistemología e historia de la ciencia* (30),pp. 76-78.
- FAO, (2016). *La trazabilidad. Una herramienta de gestión para las empresas y los gobiernos*. Roma, pp.1-2
- Barrio, *et al.*, (2006). *El Estrés como Respuesta*. INFAD. España, 1(1), pp. 37-48.

- Góngora, (2010). Reconocimiento y manejo del distress, sufrimiento y dolor en animales de laboratorio: una revisión. Fundación Universitaria Konrad Lorenz, Colombia, p.196.
- Torretti, (2010). La proliferación de los conceptos de especie en la biología evolucionista. BIBLID, 25, p. 327.
- Padmanabhan, (2014). Handbook of pharmacogenomics and stratified medicine. Academic Press, pp. 73-87.
- Torrades, (2002). Diversidad del genoma humano: los polimorfismos. OFFARM, 21(5), pp.122-123.
- ASPA, (2010). Directive 2010/63/EU of the european parliament and of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Art. 3.
- Maschi, *et al.*, (2019). De reactivo biológico al animal sintiente: el bienestar animal como cambio de paradigma en la investigación biomédica y su impacto en los resultados. *Analecta Veterinaria*, 39 (1), pp. 21-25.
- Mellor, *et al.*, (2015). Caring for wildlife. WAZA. Suiza, pp.19-23.

- Smith, *et al.*, (2018). Classification and reporting of severity experienced by animals used in scientific procedures. *Laboratory animals*, 52 (1), pp. 5-57.
- Akhtar, (2015). The flaws and human harms of animal experimentation. *Cambridge Quarterly of Healthcare Ethics*, 24(4), pp. 407-419.
- Monteiro, *et al.*, (2009). Trends in animal experimentation. *Brazilian Journal Of Cardiovascular Surgery*, 4 (24) , pp. 506 – 513.
- FBR, (2016). Mice and Rats. The essential need for animals in medical research, 4, pp. 1-2.
- S. Dutta, P. Sengupta (2016). Men and mice: Relating their ages. *Life sciences*, (152), pp. 244-248.
- P. Sengupta (2012) , The laboratory rat: relating its age with humans, *International Journal of Preventive Medicine*, (4), pp. 624–630.
- Tator, *et al.*, (2012). Translational potential of preclinical trials of neuroprotection through pharmacotherapy for spinal cord injury. *Journal of neurosurgery spine*, 17(1), p.182.

- Baumans, (2005). Science-based assessment of animal welfare: laboratory animals. *Revue scientifique et technique* (International Office of Epizootics), 24 (2), pp. 503-514.
- Farnaud, (2009). *The Evolution of the Three Rs*. London, UK. ATLA, 87, p. 19.
- Deacon, *et al.*, (2007). A comparison of the behavior of C57BL/6 and C57BL/10 mice. *Behavioral Brain Research*, 179(2) , pp.230-247.
- Benavides, *et al.*, (2019). Genetic quality assurance and genetic monitoring of laboratory mice and rats: FELASA Working Group Report, 54(2), pp. 135-148.
- Benavides, *et al.*, (2014). *Manual de genética de roedores de laboratorio*. SECAL. España, Madrid, pp.88-101.
- Tortajada, (2015). *Diferenciación de poblaciones de rotíferos y efectos en la reproducción interpoblacional*. Tesis doctoral, Universidad de Valencia, p.15.
- Burgio, *et al.*, (2012). Nasal Bone Shape Is under Complex Epistatic Genetic Control in Mouse Interspecific Recombinant Congenic Strains. *Plos One*, 7(5), p. 5.

- Benavides, *et al.*, (2014). Manual de genética de roedores de laboratorio. SECAL. España, Madrid, pp.263-296.
- Olson, *et al.*, (2014). Handbook of pharmacogenomics and stratified medicine. Elsevier, p.82.
- Chia, *et al.*, (2005). The origins and uses of mouse outbred stocks. *Nat Genet*, 37: pp. 1181–1186.
- Simecek, *et al.*, (2017). Mapas de alta resolución de poblaciones de referencia de ratones. *G3 (Bethesda)*, 7, pp. 3427-3434.
- Guenet, *et al.*, (2015). *Genetics of the Mouse*, Berlin: Springer. pp. 51-88.
- Trujillo, *et al.*, (2017). El complejo mayor de histocompatibilidad. Organización genética, estructura, localización y función .*Panorama. Cuba y Salud*, 13(1), pp. 53-57.
- Stuart, (2015). Major histocompatibility complex (MHC): Mouse. SLU, Missouri, USA, pp. 1-5.
- Mai (2012). Importancia del control genético en animales de laboratorio. Comisión honoraria de experimentación

animal. Uruguay. Obtenido de:
http://www.urbe.fmed.edu.uy/cursos/animales_experimentacion/Genetica.pdf

- Lodish, *et al.*, (2000). Molecular cell biology. Mutations: Types and causes. 4^o ed. N.Y. pp. 89-102.
- Carbone, Maschi, (2006). El ratón nude (nu/nu) como modelo animal de inmunodeficiencia. Revista Química Viva, 5 (1), pp. 19-23.
- De Jesús, Torres, (2006). Evaluación de factores de reproducción para detectar posible contaminación genética en cepas consanguíneas de ratones. Boletín de Malariología y Salud Ambiental, 46 (2).
- Goldstein, *et al.*, (2018). What's in a (Sub)strain? Stem Cell Reports, 11(2), 303-305.
- Sinha, *et al.*, (2013). Algorithm of construction of optimum portfolio of stocks using genetic algorithm. Faculty of Management Studies, University of Delhi, p.9.
- Hamburg, Heidelberg, *et al.*, (2018). Substrains of Inbred Strains. GV-SOLAS, pp. 3-5.

- Wotjak CT, (2003). The importance of exact mouse strain nomenclature. *Trends Genetics*, 19: pp. 183-184.
- Yang, *et al.*, (2003). Spontaneous deletion of epilepsy gene orthologs in a mutant mouse with a low electroconvulsive threshold. *Hum Mol Genet*, 12, pp. 975-984.
- Parikh, *et al.*, (2019) .Major histocompatibility complex class I-restricted protection against murine cytomegalovirus requires missing-self recognition by the natural killer cell inhibitory Ly49 receptors. *CSH*, pp. 11-12.
- Wakchaure, *et al.*, (2015). Importance of heterosis in animals. A review. *IJAETIS*, 1(1), pp. 1-5.
- Nagy A, *et al.*, (2003). A laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Press.
- Santos, *et al.*, (2004). Últimas investigaciones en biología: células madre y células embrionarias. Ministerio de educación y ciencia. España, p,92.
- Chengyu (2013). Pronuclear microinjection and oviduct transfer procedures for transgenic mouse production. *Methods in molecular biology*. Clifton, N.J, 10(7),pp. 217-32.

- Rulicke, *et al.*, (2007). FELASA guidelines for the production and nomenclature of transgenic rodents. *Laboratory animals*. London, Uk, 41(3), pp. 301-311.
- Austin, *et al.*, (2004). The knockout mouse project. *Nat Genet*, 36(9), pp. 921–924.
- Beal, *et al.*, (2020). Chemically induced mutations in a MutaMouse reporter gene inform mechanisms underlying human cancer mutational signatures. *Communications biology*, 3(438), pp. 12-15.
- Gordon, *et al.*, (1981). Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science* 1981, 214, pp.1244–1246.
- Bellester, *et al.*, (2004). Real-time quantitative PCR-based system for determining transgene copy number in transgenic animals. *BioTechniques*, 37, pp. 610-613.
- Gullace, (nd). El animal de laboratorio como reactivo biológico. Facultad de ciencias veterinarias. Buenos Aires: pp. 5-7.
- MINSA, (2008). Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio. Lima, Perú: pp. 5-19

- Zuñiga, *et al.*, (2016). Ciencia y tecnología en experimentación y protección animal. SECAL. España, Madrid, pp. 313-338.
- Abolins, *et al.*, (2017). The comparative immunology of wild and laboratory mice. *Mus musculus domesticus*. *Nat Commun* 14(8). pp. 3-5.
- Reese, *et al.*, (2016). Sequential infection with common pathogens promotes human-like immune gene expression and altered vaccine response. *Cell Host Microbe*, 19(5), pp. 713–719.
- Cadwell K, (2015). The virome in host health and disease. *Immunity*, 42 (5), pp. 805-813.
- Markey, *et al.*, (2018). Pre-colonization with the commensal fungus *Candida albicans* reduces murine susceptibility to *Clostridium difficile* infection. *Gut Microbes*, 9 (6), pp. 497-509.
- Masopust, *et al.*, (2017). Of mice, dirty mice, and men: using mice to understand human immunology, 199 (2), pp. 383-388.
- FELASA, (2014). recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *The laboratory animals*, 48(3), pp. 178–192.

- Correa, *et al.*, (2009). La experimentación animal y la salud humana. Nuestros deberes éticos con los demás seres vivos. *Revista bioética latinoamericana*, 2(3), pp. 2-16.
- ILAR, (2010). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8^a Ed. Washington, D.C. The National Academies Press.
- Brambell, (1965). *Report of the Technical Committee to Enquire into the Welfare of Animals kept under Intensive Livestock Husbandry Systems*. HMSO, London, UK.
- Broom, D.M. 1986. Indicators of poor welfare. *British Vet. J.* 142, pp. 524-526.
- McCulloch (2013). A Critique of FAWC. Five Freedoms as a Framework for the Analysis of Animal Welfare. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 26, pp. 959-975.
- Proctor, *et al.*, (2013). Searching for animal sentience: a systematic review of the scientific literature. *Animals*, 3, pp. 882-906.
- European Union. (1997). *Treaty of Amsterdam*. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.

- Duncan, I.J.H. (2005). Science-based assessment of animal welfare: farm animals. *Revue scientifique et technique* (International Office of Epizootics), 24 (2), pp. 483-492.

- Whay HR. 2007. The journey to animal welfare improvement. *Animal Welfare*, 16, pp. 117- 122.

- Dawkins, M.S. (2008). Animal suffering. The science of animal welfare. *Ethology*, 114, pp. 937-945.

- Broom, (2007). *Domestic animal behavior and welfare*. CAB International, Wallingford, UK. 4, pp. 60-85.

- OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. 2008. Código Sanitario para los Animales Terrestres, 2008. Título 7. Bienestar de los animales.

- Morton, (2005). Punto final humanitario en la experimentación animal para la investigación biomédica: aspectos éticos, legales y prácticos. *Laboratory Animal*, 8, pp. 5-12.

- CCCA, (1991). Categories of invasiveness in animal experiments. Ottawa ON. Canada. Obtenido de:

https://ccac.ca/Documents/Standards/Policies/Categories_of_invasiveness.pdf.

- Navarro, (2019). Trabajo profesional realizado sobre animales de laboratorio utilizados en experimentación. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, pp. 9-17.
- OCDE, (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. ENV/JM/MONO,7, p. 41.
- CONICYT, (2003). Aspectos bioéticos de la experimentación animal. 4to Taller de Bioética organizado por Comité Asesor de Bioética, FONDECYT-CONICYT. pp. 69-77.
- Broom, D.M. (1986). Indicators of poor welfare. British Vet. J. 142, pp. 524-526.

- European Union, (1997). Treaty of Amsterdam. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg. pp. 24-33.
- Whay HR, (2007). The journey to animal welfare improvement. *Animal Welfare*, 16, pp. 117- 122.
- Dawkins, M.S. 2008. Animal suffering. The science of animal welfare. *Ethology*, 114, pp. 937-945.
- Andersen, *et al.*, (2016). Rodent Model as Tools in Ethical Biomedical Research. Suiza. Springer, p. 13.
- Navarro, (2019). Trabajo profesional realizado sobre animales de laboratorio utilizados en experimentación. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México. pp. 25-29
- Neil, *et al.*, (2003). Guidelines on: Laboratory animal facilities-characteristics, design and development. Ottawa ON. Canadá. Canadian Council on Animal Care, p.57.
- Azar, *et al.*, (2008). Effect of Housing Rats in Dim Light or Long Nights on Heart Rate. *The Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2008 Jul, 47(4): pp. 25–34.

- Airistar Technologies. (2005). Frequency of Air Changes per Hour – A Key Consideration in Selecting Air Purification Systems. Business Briefing: Hospital Engineering and Facilities Management. p. 2.
- Fox, *et al.*, (2007). The Mouse in Biomedical Research Diseases. 2^o Ed. American College of Laboratory Animal Medicine Series. Elsevier, 2(1), p. 297.
- Blanes, *et al.*, (2010). The Fundamentals of Experiments with Animals – Applications in Experimental Surgery. Department of Surgery, Faculdade de Medicina da Universidad de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil, p.105.
- Voipio, *et al.*, (2006). Role of cage material, working style and hearing sensitivity in perception of animal care noise. Lab Anim. Oct, 40 (4), pp. 400-409.
- Patterson, *et al.*, (2006). Noise Exposure, Music, and Animals in the Laboratory: A Commentary Based on Laboratory Animal Refinement and Enrichment Forum (LAREF) Discussions. Journal of Applied Animal Welfare Science, 9 (4), pp. 328-329.

- Krinke, *et al.*, (2000). *The Laboratory Rat*. 1ra Ed. Academic Press, p.47.

- Recordati, *et al.*, (2014). Pathologic and environmental studies provide new pathogenetic insights into ringtail of laboratory mice. *Veterinary Pathology*, pp.1-12.

- Gerald, *et al.*, (2006). Mass Generation Rates of Ammonia, Moisture, and Heat Production in Mouse Cages with Two Bedding Types, Two Mouse Strains, and Two Room Relative Humidities. *American Society of Heating, Refrigerating and Air-Conditioning Engineers, Inc.* 112 (1), p.134.