EL ANIMAL COMO SUJETO EXPERIMENTAL
ASPECTOS TÉCNICOS Y ÉTICOS

Carmen Alicia Cardozo de Martínez • Afife Mrad de Osorio
Constanza Martínez C. • Eduardo Rodriguez Yunta
Fernando Lolas Stepke

Centro Interdisciplinario de Estudios en Bioética (CIEB)
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo
Universidad de Chile

EL ANIMAL COMO SUJETO EXPERIMENTAL. ASPECTOS TÉCNICOS Y ÉTICOS
© CIEB, Universidad de Chile
Primera edición, marzo de 2007

http://www.uchile.cl/bioetica/
e-mail: c-bio@uchile.cl

Registro de Propiedad Intelectual Nº
ISBN:

Diseño y diagramación: Fabiola Hurtado Céspedes

Impreso: Andros Impresores.
Impreso en Chile

Ninguna parte de esta publicación, incluyendo el diseño de la cubierta, puede ser reproducida, almacenada o transmitida por medio alguno, ya sea eléctrico, químico, mecánico, óptico, de grabación o fotocopia, sin autorización previa el editor.

EL ANIMAL COMO SUJETO EXPERIMENTAL
ASPECTOS TÉCNICOS Y ÉTICOS

Carmen Alicia Cardozo de Martínez • Afife Mrad de Osorio
Constanza Martínez C. • Eduardo Rodriguez Yunta
Fernando Lolas Stepke

Centro Interdisciplinario de Estudios en Bioética (CIEB)
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo
Universidad de Chile

ÍNDICE

AUTORES 11

INTRODUCCIÓN
La investigación con animales: una bioética para la ciencia de fronteras 13

1. CARACTERÍSTICAS DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO 21
El animal experimental como reactivo biológico 21
Aspectos que modulan, regulan e influyen en
la experimentación y en el bienestar del modelo animal 22
Control sanitario e higiene 23
Clasificación y características de las barreras 29
Lista de barreras sanitarias 31
Genética y control genético 32
Tipos genéticos 33
Colonias exocriadas 34
Cepas endocriadas 35
Híbridos 35
Colonias parcialmente endocriadas 36
Cepas endocriadas apareadas al azar 36
Cepas endocriadas recombinantes 36
Mutantes 36
Cepas congénicas 37
Cepas coisogénicas 37
Subcepas y desviación genética 37
Métodos de apareamiento 38
Control genético 38
Banco de embriones 39
Elección del modelo genético 40
Nomenclatura 41
Fuentes de animales definidos 42
Centros de referencia genética 42

Monitoreo genético 43
Salas de animales 44
Recepción 45
Cuarentena y acondiciomaniento 46
Áreas de producción y mantenimiento de animales 46
Área para procedimientos 46
Área de cirugía 47
Área de recuperación 47
Ambiente 47
Alojamiento 48
Recomendaciones de espacio 49
Temperatura y humedad 51
Ventilación 53
Iluminación 55
Ruido 56
Alimentación 57
Agua 59
Cama 59
Jaulas 61
Factores ambientales y genéticos que regulan al animal de experimentación (compendio) 63
Especies más utilizadas en experimentación biomédica 64

2. ASPECTOS EN EL MANEJO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACION 67
Animales de experimentación y desarrollo biotecnológico 67
Recomendaciones para el tratamiento de los animales experimentales 69
El bienestar del animal como requisito de calidad 69

3. ANESTESIA, ANALGESIA Y EUTANASIA 73
Anestesia 73
Analgesia 73
Eutanasia 73
Punto final 83

4. ALTERNATIVAS AL USO DE ANIMALES DE LABORATORIO 85
¿Qué son los métodos alternativos? 86
Las tres R de Russell y Burch 86
El principio de las tres R como expresión de virtudes y valores 91

5. LOS ANIMALES DE LABORATORIO COMO MODELOS PARA ENFERMEDADES HUMANAS 93
Uso de transgénicos como modelos animales 95
Animales genéticamente modificados con el propósito de generar biofarmacias 98
Uso de animales como modelos para probar vacunas 99
Uso de animales como modelos para pruebas de toxicidad 100

6. CONSIDERACIONES ÉTICAS 102
Estatuto moral de los animales 104
Los animales: seres sintientes 107
La investigación con animales como modelos de enfermedades humanas 111
Modificaciones genéticas 113
Principios éticos 115
Principios éticos básicos de la experimentación animal como reactivo biológico 116
Principios de ética de la experimentación animal, adoptados en Talloires (1979) 117
Principios éticos del CCAC 117
Principios éticos internacionales Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS) para investigación biomédica con animales 119
Principios del gobierno de Estados Unidos de América para la utilización y cuidado de los animales vertebrados usados en la investigación científica, las pruebas de laboratorio y la enseñanza 120
Dilemas éticos 123
Los animales, ¿tienen derechos? 128

7. COMITÉS INSTITUCIONALES PARA EL CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES 133
Características 133
Protocolo para el cuidado y uso de los animales 136

8. LA SITUACIÓN LATINOAMERICANA EN LA INVESTIGACIÓN CON ANIMALES EXPERIMENTALES 139

ANEXOS 145

FORMULARIO PARA LA EVALUACIÓN DE PROYECTOS QUE INVOLUCRAN ANIMALES DE LABORATORIO 145

I. REGULACIONES 149

II. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE DIFERENTES ESPECIES ANIMALES 165

III. DOSIS DE ANESTÉSICOS UTILIZADAS EN ROEDORES Y CONEJOS 166

IV. DATOS DE CRÍA Y REPRODUCCIÓN 167

V. PARÁMETROS FISIOLÓGICOS Y NUTRICIONALES 168

RECOMENDACIONES PARA EUTANASIA 169

VI. BIBLIOGRAFÍA 171
Alternativas 171
Anestesia y dolor 172
Bienestar animal 174
Bioseguridad 175
Cirugía 177
Cuidado y manejo de los animales de laboratorio 178
Diseño experimental y tamaño de la muestra 181
Diseño y construcción de instalaciones para animales 182
Educación profesional y técnica 184
Ética 185
Eutanasia 186
Farmacología y terapéutica 187
Genética y nomenclatura 188
Modelos animales 189

Nutrición 190
Parasitología 193
Patología y patología clínica 193
Recursos 195
Referencias generales 195
Tipos de animales 196
Anfibios, reptiles, y peces 196
Animales silvestres, exóticos y de zoológico 197
Animales de granja 198
Aves 200
Perros y gatos 201
Primates no-humanos 201
Roedores y conejos 203
Otros animales 206

VII. PUBLICACIONES PERIÓDICAS 207

VIII. SELECCIÓN DE ORGANIZACIONES RELACIONADAS CON LA CIENCIA DE ANIMALES DE LABORATORIO 211

IX. GLOSARIO 217

AGRADECIMIENTOS 227

AUTORES

Carmen Alicia Cardozo de Martínez: Odontóloga Universidad Javeriana, Magíster en Periodoncia Universidad Nacional. Profesora Asociada Facultad de Odontología, Investigadora principal Grupo Reactivos Biológicos Instituto de Biotecnología, Coordinadora Red de Bioética Universidad Nacional de Colombia, Bogotá Colombia, Programa Internacional de Posgrado en Etica en Investigación Biomédica y Psicosocial Grant # 1R25TW06056-01, *Fogarty International Center* (FYC) de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de Estados Unidos.

Afife Mrad de Osorio: Química Farmacéutica Universidad Nacional de Colombia, Especialista en Ciencia y Tecnología de Animales Experimentales, Escuela Paulista de Medicina, São Paulo Brasil, Profesora Honoraria Universidad Nacional de Colombia. Investigadora Grupo Reactivos Biológicos Instituto de Biotecnología.

Constanza Martínez C.: Odontóloga Universidad Nacional de Colombia, Magíster en Bioquímica Universidad Nacional. Certificación Auditora de la Calidad en laboratorios de investigación, estudiante doctorado en Biología Molecular, Celular y Neurociencias Universidad de Chile, Investigadora Grupo Reactivos Biológicos Instituto de Biotecnología.

Eduardo Rodriguez Yunta: Doctor en Biología Celular y Molecular. Master en Teología, especialidad Ética. España. Coordinador del Programa de Formación Ética de la Investigación Biomédica y Psicosocial, Centro Interdisciplinario de Estudios en Bioética, Universidad de Chile.

Fernando Lolas Stepke: Médico Psiquiatra. Profesor Titular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Académico de Número

de la Academia Chilena de la Lengua y Académico Correspondiente de la Real Academia Española. Profesor Visitante en universidades de América Latina, Norteamérica y Europa. Director del Programa de Bioética OPS/OMS y del Centro Interdisciplinario de Estudios en Bioética de la Universidad de Chile.

INTRODUCCIÓN
La investigación con animales: una bioética para la ciencia de fronteras

El método experimental y el conocimiento

Las ciencias experimentales deben su desarrollo a numerosos supuestos culturales. Entre ellos, las nociones de realidad, verdad y experiencia han sufrido avatares históricos que tipifican épocas y estilos del pensamiento científico. Tal vez lo que más caracteriza a la ciencia occidental sea la idea del método como un camino privilegiado para arribar a certidumbres. Lo que la modernidad introduce, especialmente desde el *Novum Organum*, no es sólo la posibilidad de que la razón, como facultad humana, permita conocer y eventualmente dominar la naturaleza, sino su aplicación a las preguntas regladas, limitadas y especificables que vinieron a conocerse como *experimentos*. La fantasía de muchos sabios fue la del "*experimentum crucis*", aquel arreglo de condiciones y circunstancias que permitirían resolver de una vez y para siempre un problema específico. El nudo gordiano de la duda eliminado con un golpe bien asestado al corazón de la naturaleza. Si la *analogía* y la *especulación* fueron, en su momento, métodos para el conocimiento de la naturaleza, el experimento vino a significar el dominio no sólo de la forma de preguntar sino de las respuestas posibles. La misma distinción entre lo inanimado y lo animado, entre lo inorgánico y lo orgánico, fue resuelta mediante el clásico experimento de Wöhler y la síntesis de la urea. La medicina científica, decía Claude Bernard, ha de ser la medicina experimental. Los postulados de Koch resumen, en lo esencial, el pensamiento experimental aplicado a la naciente microbiología en su vertiente terapéutica.

No necesitamos recalcar la oposición, que el pensamiento ilustrado quizá percibió tenuemente, entre *experiencia* humana –una dimensión del espíritu individual– y *experimento* científico –una dimensión del método. La primera conduce a formas implícitas o tácitas de conocimiento, difíciles de comunicar mediante retóricas universales y, por ello, relegadas a lo inefable personal. El segundo alcanza el virtuosismo de una dominación de la naturaleza a manos de un interrogador hábil. La *natura naturans* es reemplazada por la *natura naturata*, domeñada, estilizada y "artificializada" en el experimento. La imaginación, decía un grande de la ciencia francesa, debe colgarse con el abrigo a la entrada del laboratorio. La fantasía debe permitir planear buenos experimentos; no sirve, ni debe servir, para interpretar sus resultados.

Los medios de que se sirve el espíritu experimental han tenido diversa fortuna. Los planos inclinados, la sustancias químicas, los arreglos de objetos para permitir la influencia de fuerzas, las retortas, matraces e implementos que permiten el libre juego de lo natural y aseguran su observación, fundaron las ciencias de la naturaleza inanimada. En algún momento, los seres vivos se convirtieron en medios privilegiados para obtener datos, informaciones y certidumbres.

Humanidad y animales en el conocimiento científico

La convivencia entre la especie humana y otras especies animales ha adoptado diversas formas. La caza, la domesticación, la crianza controlada, la utilización como alimento, son algunas. La muerte sacrificial para aplacar divinidades, la reverencia ritual a ciertos animales (el buey Apis, el cocodrilo, el Anubis, el toro, el halcón, el águila) y sus derivaciones totémicas indican una identificación con fuerzas y poderes que engloban por igual a hombres y otros seres vivos. La caza, la pesca, las corridas de toros, las riñas de gallos o de perros atestiguan una dominación en parte lúdica, en parte agresiva y violenta.

En todos estos ejemplos, necesariamente esquemáticos, se intuye la centralidad de la idea del animal como fuente y origen de conocimiento. Ya sea de la naturaleza en general, de animales en particular, o aún de la humanidad. El animal, concebido a la manera de LaMettrie o Descartes como autómata o máquina, o pensado como creación divina y partícipe del destino humano, ayuda a conocer y conocerse. La noción judeocristiana de la especie humana como cimera y culminación de la naturaleza no hace sino reflejar el antropocentrismo de las culturas que luego cultivaron las ciencias. Al menos las experimentales, en el sentido de obtener sus certidumbres por preguntas acotadas, métodos reglados y retóricas falseables por la observación empírica.

El uso del animal como fuente de conocimientos experimentales tiene ya una larga tradición. Toda la moderna farmacología, la fisiología, la toxicología, la algología, la psicología, la etología, por sólo mencionar disciplinas de evidente aplicación a los asuntos humanos, se ha basado en someter animales a experimentos o en observar la ocurrencia espontánea de fenómenos en ellos. Cuando la sacralidad del cuerpo humano era norma y prohibición para las disecciones, eran animales los que brindaban, por analogía, el conocimiento de sus entrañas al servicio de la medicina. Cuando existen intervenciones riesgosas o dañinas, son animales quienes primero deben exponer sus vidas. Cuando los estudiantes de medicina y ciencias biológicas deben conocer el funcionamiento de los sistemas orgánicos, en y con animales se realiza el aprendizaje. La estructura de las ciencias médicas sería inconcebible sin el empleo de animales y sin su sometimiento a condiciones que la conciencia moral prohíbe imponer a seres humanos.

También en las ciencias del comportamiento han sido protagonistas los animales. La psicología científica, si bien se inauguró con la introspección como método en la era de Wilhelm Wundt y sus sucesores funcionalistas y estructuralistas, pasó luego a pretender el estatuto de una ciencia cuantificable, nomotética y universal. El conductismo, en su expresión

más metafísica, avalaba el empleo de cualquier ser viviente para descubrir las leyes inmutables del refuerzo y la predicción del comportamiento. Así, el perro de Pavlov, la rata de Skinner, el gato de Thorndike, el mono de Köhler fueron epítomes de una saga de construcciones teóricas de incalculable valor para la ciencia psicológica. Lo que esos experimentos enseñaron se extrapoló al comportamiento humano y fundamentó desde intervenciones en la industria y la escuela hasta formas especializadas de terapéutica.

Aunque es verdad que la tendencia ha sido a reducir o limitar el uso de animales en la experimentación, el tema está lejos de cerrarse. Los antivivisecciónistas del pasado encuentran hoy renovados bríos en la defensa de los derechos de los animales, que algunos quisieran ver elevados al rango de derechos constitucionales. Cuando esta idea se propaló en Alemania, por ejemplo, se inmediato se observó que ello dañaría los estudios experimentales.

Conciencia moral y experimentación animal

En la actualidad, las ciencias biomédicas obtienen su información relevante de distintos tipos de arreglo experimental. Los estudios *in vitro* utilizan sustancias, tejidos y células. Los experimentos *in vivo* típicamente emplean animales y la expresión no suele usarse rutinariamente para los estudios *en sujetos humanos*, en los que quizá una tradición embarazosa evita hablar de experimento. Cada vez más se propugna la noción de experimentos *in silico* para aludir a aquellas simulaciones realizadas en computadores, que pueden generar nuevo conocimiento utilizando los registros e informaciones almacenados en grandes bases de datos. Aunque no suele hablarse de experimento para tratar los derivados cognoscitivos del *metaanálisis*, esta técnica de reanálisis de la literatura científica permite consolidar o crear evidencias "sumergidas" y dispersas en publicaciones, y cabe hablar de un experimento *in acta.* Finalmente, recordando la época

de la medicina romántica, cabe pensar en experimentos *in intellectus*, esto es, experimentos imaginarios, no suficientemente reconocidos por el "*establishment*" científico pero, probablemente, muy frecuentes como anticipo de auténticos diseños experimentales.

Al igual que los sujetos humanos, los animales no son máquinas pasivas de respuesta. Re-accionan, esto es, responden según el contexto en que se hallen. Eso es precisamente el com-portamiento. Los animales se com-portan: se portan o conducen "con" el entorno, y de allí surge un grado de impredecibilidad mayor que en el caso de materiales inanimados. Por cierto, la gran contribución del conductismo metafísico fue insistir en la matematización del comportamiento y en su sujeción a leyes relativamente estables. Al igual que en el caso de los humanos, aún cuando no se explora al animal completo sino alguno de sus órganos o tejidos, la cantidad de variables que inciden sobre la respuesta es muy amplia: constitución genética, forma de crianza, condiciones ambientales pasadas y presentes, nutrición, por sólo mencionar algunas. Como "reactivo", el biológico tiene muchos grados de incertidumbre, cuyo control es justamente el motivo de exigentes estudios. La provisión de individuos de características conocidas es una industria indispensable en la investigación biomédica.

La reactividad del animal experimental no solamente es una fuente de imprecisiones que afecta desde el tamaño muestral hasta la confiabilidad de los datos recogidos. Es, asimismo, uno de los fundamentos para sostener que el experimento *in vivo*, como el humano, es más un diálogo que una mera actividad técnica. La dignidad de la vida, en cualquiera de sus formas, exige un cuidadoso trabajo de formación y reflexión que no siempre queda cabalmente reflejado en los planes de estudio o la labor profesional de los investigadores. Si se piensa solamente en los millones de ratas, gatos, perros, palomas, monos, cerdos o peces sacrificados en nombre de la ciencia, y se formula la pregunta de qué autoriza a usarlos de esa forma, para satisfacer necesidades y deseos humanos, puede llegarse a

pensamientos inquietantes. No es necesario invocar, como el australiano Peter Singer, el concepto de "especieísmo" o recordar aquellos sabios caballos parlantes de Jonathan Swift para reconocer que el egoísmo de la especie humana requiere argumentos sólidos y una continua reflexión. Sin los extremos de un radicalismo "anti" (anti-experimentos, anti-ciencia, anti-industria), el adecuado balance entre necesidad y compasión es materia de estudio y de formación.

Debe recordarse que el animal creado y criado en y para el laboratorio puede ser distinto de su contraparte silvestre. Por más que ese sea el caso, la vida merece respeto y cuidado, no solamente atendiendo a que es un medio privilegiado para un buen fin sino a que se trata de un fin en sí misma. Podrán los animales tener menos de la capacidad introspectiva de los seres humanos (esa capacidad de "ensimismarse" de la que habla Ortega y Gasset), parecerán tener menos autoconciencia, pero que padecen dolor, nostalgia, alegría y pena y exhiben características individuales, en el caso de los mamíferos, parece incontrovertible fundamento de una ética de la relación entre especies. Aunque el ambiente del laboratorio es uno entre los muchos que moldean esta relación, se trata sin duda de uno de los mejor institucionalizados. Es la destreza en el manejo del animal experimental una de las marcas del investigador que se inicia. Decía un neurofisiólogo mexicano: "en este laboratorio, el único que tiene razón es el gato", indicando que la pregunta correcta puede arrojar respuestas adecuadas solamente si el interrogado es tratado con el cuidado de un buen informante y respetado en sus fueros de ser vivo.

Este volumen recoge algunos conceptos fundamentales en lo técnico y en lo ético para un adecuado tratamiento del sujeto experimental "animal" en el trabajo científico. Resume temas que todo investigador debe conocer para el uso y cuidado de los animales (desde el punto de vista genético, sanitario, de albergue, alimentación, categorización y especies más utilizadas en investigación). Presenta también un breve examen sobre

los diferentes modelos animales usados para investigación en patologías humanas y la situación latinoamericana en relación con la investigación en este campo. Se incluye el manejo de animales en proyectos de investigación y la administración adecuada de anestesia, analgesia y eutanasia.

Dedicamos un apartado especial a las alternativas a modelos animales, por considerarlo tema de vital importancia, no sólo para la obtención de adecuados resultados investigativos, sino por las consideraciones éticas y los acuerdos internacionales vigentes. Dentro de esas consideraciones tratamos de reconciliar varias miradas: la proteccionista de los derechos de los animales, el equilibrio reflexivo en relación con los dilemas en el desarrollo y uso de modelos transgénicos para patologías humanas, y el respeto frente a seres sintientes, desde la ética sensitivo naturalista. Para cerrar, presentamos algunos aspectos relacionados con la conformación y funcionamiento de comités de uso y cuidado de animales de experimentación.

Finalmente, se anexan datos relacionados con regulaciones, características de animales, dosis de anestésicos, datos de cría, bibliografía, selección de organizaciones de ciencia y tecnología de animales y un glosario.

El Centro Interdisciplinario de Estudios en Bioética (CIEB) de la Universidad de Chile, a través de sus diversas actividades y proyectos, aborda los aspectos conceptuales, metódicos y morales del trabajo científico. La contribución que ahora se presenta, sin duda perfectible, espera contribuir a la mejor formación de los estudiantes y a la reflexión de los investigadores. Muchas omisiones se deben a la ignorancia y muchas ignorancias se traducen en omisiones, porque no cabe pensar que un espíritu científico auténtico se deleite en cometer aberrantes crueldades con los seres vivos, nuestros compañeros "biosféricos" en la tarea de la supervivencia.

Fernando Lolas Stepke

1. CARACTERÍSTICAS DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO

El animal experimental como reactivo biológico

Se trata de un animal cuya calidad genética y ambiental ha sido controlada y asegurada y, por tanto, es capaz de dar una respuesta fiable y reproducible a la pregunta experimental. Se suma a ello todas las consideraciones de cuidado para el bienestar de cada uno según especie y sus requerimientos etológicos, de manera que no se no generen alteraciones o adaptaciones que modifiquen el modelo animal, alterando la respuesta investigativa.

Para obtener este tipo de animal es necesario conocer el concepto de "barrera"[1] (que comprende las medidas y condiciones bajo las cuales se producen y reproducen los animales en los bioterios), para garantizar que mantenga condiciones definidas, tanto desde el punto de vista genético como sanitario.

El concepto "homogeneidad del reactivo biológico" implica definir las condiciones del animal en cuanto a características somáticas –peso, sexo y edad–, genéticas –igualdad o similitud biológica de su información genética a partir del mantenimiento de una tasa de consanguinidad elevada– y sanitarias –según los requerimientos del experimento: axénicos (sin gérmenes), gnotoxénicos (con gérmenes controlados) o estándares con flora nativa.

1 La temperatura adecuada para cada especie; nivel de ruido, intensidad de la luz, paso por autoclave de las cajas, camas y del agua y la comida de los animales; verificación por control microbiológico medioambiental de las condiciones de las salas de cría y mantenimiento de los animales; cambio de ropa de investigadores y operarios para el ingreso a las salas de animales, son algunas de barreras que garantizan que no se introduzcan nuevas bacterias o contaminantes que alteren o cambien el modelo animal.

Aspectos que modulan, regulan e influyen en la experimentación y en el bienestar del modelo animal

El cuidado, la utilización apropiada y el trato humanitario de los animales empleados en investigación, pruebas de laboratorio y educación requieren de un conocimiento especializado de los ambientes, procesos y procedimientos relacionados con su uso y cuidado. Ello también implica el establecimiento de condiciones de infraestructura y ambientes de trabajo propios y específicos. En la actualidad, en la mayoría de los países que cuentan con esta ciencia y tecnología desarrolladas, se exige que dichas condiciones sean certificadas y categorizadas según competencias y necesidades. Por eso, es importante la formulación de un programa de aseguramiento de la calidad que incluya control sanitario y genético, y entrenamiento y validación permanente de procesos y procedimientos de laboratorio (dentro de ellos, el conocimiento de la etología de cada especie animal utilizada).

Se debe planear un adecuado ambiente físico y social, hospedaje, espacio y manejo para el albergue de los animales, considerando factores como:

- La especie, raza o cepa de animales y sus características individuales tales como sexo, edad, tamaño, conducta y salud.
- La habilidad de los animales para integrar grupos con sus semejantes, a través de la vista, olfato y posible contacto, ya sea que los animales se mantengan aislados o en grupos.
- El diseño y construcción del alojamiento.
- La disponibilidad y adecuación de elementos enriquecedores del medio ambiente.
- Las metas del proyecto y el diseño experimental (por ejemplo, producción, crianza, investigación, pruebas de laboratorio y educación).
- La intensidad de la manipulación animal y el grado de alteración, cambio o patología que puedan causar los procedimientos.

- La presencia de materiales peligrosos o que causen enfermedad.
- La duración del período de permanencia de los animales.

Esto implica que el diseño de las áreas de albergue, las zonas de trabajo y las áreas de almacenamiento, lavado, esterilización y desplazamiento deben ser cuidadosamente diseñadas por personal experto en el tema. El equipo de trabajo, además de ser idóneo, debe contar con el apoyo de un CICUAL (Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio), que vele porque cada proyecto de investigación cumpla con los requisitos adecuados y humanitarios de trato y manejo de los animales, y garantice la capacitación y entrenamiento requeridos por los investigadores y el personal que se aproxime a los animales.

Control sanitario e higiene

Constituye el programa básico de cuidado de los animales en salas de experimentación o bioterios. Allí los animales se integran a una serie de cuidados sanitarios que les protege de microorganismos no definidos como parte de su condición y, por otro lado, se resguarda a quienes los manejan de no contaminarse de microorganismos, especialmente de tipo zoonótico. Este programa incluye procedimientos de rutina diaria, semanal o mensual que permiten la óptima remoción de materiales y elementos potencialmente colonizables por microorganismos que pueden afectar el entorno y la condición biológica del mismo animal. Para ello es indispensable establecer parámetros de monitoreo sanitario al animal y a su medio de albergue.

Se hace referencia a la práctica repetida de una batería de pruebas, por un lado, para evidenciar que el animal mantiene las características de la flora con las cuales fue certificado para el tipo de estudio diseñado y, por otro, para hacer un seguimiento permanente a las condiciones del medio ambiente donde se aloja y cuida el animal, verificando de manera constante y periódica el no ingreso de nuevos microorganismos

que puedan introducir cambios o variables en éste. El control al material biológico incluye evaluación sexológica, de heces y orina; el no biológico, peritaje del agua, comida, cama, cajas y medioambiente.

El mantenimiento adecuado y estable de las condiciones microbiológicas requiere la definición de protocolos de higiene, desinfección y esterilización, tanto del material biológico como no biológico, y del medio ambiente. Para eso es importante tener claramente definidos los protocolos de su obtención, definición y sustento conceptual y científico.

La frecuencia e intensidad de los procedimientos de limpieza dependen de las características fisiológicas y conducta normal del animal. Los métodos de intervenciones higiénicas varían de acuerdo con muchos factores, entre ellos: tamaño, tipo y propiedades físicas del encierro; tipo, número, tamaño, edad y condición reproductiva de los animales; tipo y uso de los materiales de cama; temperatura y humedad relativa; naturaleza de los materiales que crean la necesidad de la higiene; fisiología normal y características de conducta de los animales, y rapidez con que se contaminan las superficies del albergue.

Algunos sistemas de alojamiento o protocolos experimentales pueden requerir técnicas de manejo específicos, tales como la manipulación aséptica o la modificación de la frecuencia del cambio de cama, situación que debe ser cuidadosamente evaluada por parte del investigador y el director del bioterio, pues esto puede modificar la conducta del animal y cambiar el modelo.

En las instalaciones para alojar animales no se deben usar agentes que enmascaren los olores, sustituirse las buenas prácticas de higiene o ventilación adecuada ni, tampoco, exponer a los animales a compuestos volátiles que podrían modificar los procesos fisiológicos y metabólicos básicos.

La higiene incluye la limpieza del encierro primario y secundario, con procedimientos validados y buenas prácticas de laboratorio para garantizar el bienestar animal y, por lo tanto, los resultados de las investigaciones. La detección de agentes infecciosos específicos, como los priones, requiere un manejo de protección y total destrucción en el proceso de desinfección.

La evaluación sanitaria de los animales empleados en investigación sirve para clasificarlos y, asimismo, establecer su participación según la calificación requerida para cada tipo de ensayo biológico. Asimismo, para su posible y permitido uso en docencia. Esta determinación sanitaria permite, a la vez, conocer las condiciones de producción y mantenimiento y la inexistencia de riesgos para las personas que están en contacto con ellos.

Las clasificaciones más conocidas y más utilizadas son:

- Gnotobióticos: nacen libres de gérmenes, pero se contaminan intencionalmente con determinados microorganismos.
- Axénicos (*germ free*): libres de todo germen demostrable.

Entre los métodos de obtención de los animales incluidos en los dos grupos anteriores, encontramos la histerectomía de una madre convencional, reproducción por emparentamiento de dos animales gnotobióticos, etc.

Una vez obtenidos, los animales deben dejarse en aisladores previamente esterilizados, que garanticen el mantenimiento de su calidad sanitaria. También debe seguirse el mismo protocolo con el agua, la comida, la cama y el aire. Estos métodos de obtención y mantenimiento son estrictos porque el objetivo es evitar cualquier tipo de contaminación con microorganismos a través de estas fuentes.

- Animales SPF (*specific pathogen free*): libres de patógenos específicos, mantenidos en sistemas separados del ambiente externo mediante barreras físicas, diseñadas específicamente para prevenir su

contaminación con patógenos potenciales. El término, por sí mismo, no ofrece una idea exacta de la calidad sanitaria de los animales si no se conocen los microorganismos patógenos ausentes en ellos.

- Convencionales: no necesitan barreras tan estrictas para su crianza y están libres de enfermedades transmisibles al hombre. Cuando su uso es permitido y siguiendo protocolos aprobados por comités de ética, se utilizan para docencia o entrenamiento.

Con el fin de definir mejor la calidad sanitaria de los animales de laboratorio, fueron propuestos y utilizados varios sistemas de clasificación que tienen en cuenta su flora microbiana, su carga parasitológica y su sistema de manejo.

Uno de los métodos más difundidos fue el utilizado por el ahora desaparecido Centro de Animales de Laboratorio del Consejo de Investigaciones Médicas, del Reino Unido (LAC/MRC) en su Sistema de Acreditación de Criadores de Animales de Laboratorio. Éste clasificaba los roedores y lagomorfos con estrellas y a los perros y gatos con letras. A continuación, un resumen de la clasificación por categorías y sus usos.

Una estrella: Comparable a animales criados sin barreras, tradicionalmente llamados "convencionales", pero libres de las enfermedades comunes a los animales comunicables al hombre. Éstos suelen ser útiles para colegios y universidades que enseñan ciencias biológicas.

Dos estrellas: Comparables a los llamados "convencionales", mantenidos bajo mayores patrones de manejo y, por lo tanto, no infectados con CESTODOS, lo que indicaría contaminación directa o indirecta de la colonia con otros animales. También deben estar libres de enfermedades epidémicas serias, específicas para cada especie. Pueden ser satisfactorios para algunos experimentos de corta duración.

Tres estrellas: Comparables a los derivados por histerectomía.

Cuatro estrellas: Comparables a los designados como SPF.

Los pertenecientes a las categorías de tres y cuatro estrellas están libres de un amplio rango de patógenos y son aptos para casi todas las disciplinas. Tienden a ser el grado estándar de animales de laboratorio en los países desarrollados.

Cinco estrellas: Comparables a los libres de gérmenes.

Los perros y gatos fueron divididos en cuatro categorías: A, AA, AAA y AAAA.

A: Es la inferior, basada en un examen veterinario clínico que denota un animal sano mantenido convencionalmente.

AA: Comparables a los convencionales mantenidos bajo patrones de manejo superior; libres de parásitos externos e internos, con excepción de especies de Ascaris.

AAA: Derivados por histerectomía y mantenidos bajo barreras; libres de una gran variedad de patógenos virales o bacterianos.

AAAA: Libres de todo organismo detectable, como resultado de técnicas de cría y manejo en sistemas cerrados estériles.

Para cada especie y categoría sanitaria, se publicaron las listas de los microorganismos y parásitos que deben estar ausentes cuando se realicen los exámenes de laboratorio adecuados.

Como resultado de un programa conjunto para la cooperación y desarrollo en ciencia y tecnología entre los gobiernos de Japón y Estados Unidos, se elaboró un Manual de Monitoreo Microbiológico de Animales de Laboratorio. Si bien allí no se establece una clasificación sanitaria de

los animales, se aporta una lista de agentes conocidos o sospechados como patógenos, para ratas y ratones, que pueden interferir con los resultados experimentales. También se entrega una descripción de los agentes, características de la infección, métodos de control y prevención, y métodos de ensayo del agente patógeno. Es una excelente guía para el control requerido en colonias de ratas y ratones que abastezcan animales definidos sanitariamente.

El Instituto Central para Animales Experimentales de Japón (*Central Institute for Experimental Animals, Kawasaki, Japan*), que actúa como Centro de Coordinación de Monitoreo Sanitario del Consejo Internacional de Ciencia de Animales de Laboratorio (ICLAS), propone la estandarización del monitoreo sanitario clasificando los contaminantes microbiológicos de ratas y ratones en categorías de la A hasta la E

Clasificación sanitaria de los modelos animales experimentales

Categoría actual	Denominación tradicional	Se requiere ausencia de	Barreras y manejo	Adecuados para
* Una estrella	Convencionales	Enfermedades zoonóticas	Cuidado veterinario estándar	Docencia
** Dos estrellas	Convencionales	Enfermedades epidémicas específicas	Cuidado veterinario; monitoreo microbiológico permanente	Experimentos de corta duración
*** Tres estrellas	Libres de gérmenes patógenos específicos	Organismos incapaces de pasaje transplacentario y otros, raros en colonias con alto estándar de manejo	Simples; alto estándar de manejo; definición de procedimientos operacionales estándar	Experimentación biológica y biomédica básica

**** Cuatro estrellas	Libres de gérmenes patógenos específicos	Libres de un amplio rango de patógenos	Sofisticadas; alto estándar de manejo: definición y validación de POES	Experimentación biológica y biomédica
***** Cinco estrellas	Libres de gérmenes	Cualquier organismo demostrable	Sistema cerrado estéril	Técnicas especiales y específicas en investigación biológica y biomédica

El monitoreo sanitario debe ser realizado por los laboratorios especializados en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, contaminación microbiológica y problemas de naturaleza no microbiana. El técnico que está en permanente contacto con los animales debe ser entrenado para reconocer problemas de salud y ser provisto de una lista de verificación detallada de las observaciones rutinarias.

Dada la necesidad de limitar el número de animales muestreado para ser analizado, se han desarrollado planes de muestreo basados en consideraciones estadísticas. Se requiere información previa sobre límites de confianza aceptables y porcentaje estimado de animales infectados.

Clasificación y características de las barreras

Simples:	• Ventilación con presión positiva. • Filtración de aire. • Pasteurización de la dieta. • El personal cambia su ropa exterior al entrar al bioterio. • Esterilización de las camas y jaulas.
Sofisticadas:	• Ventilación con presión positiva. • Filtración de aire para partículas mayores que 5 micrones. • Esterilización de la dieta. • El personal cambia toda su ropa al entrar al bioterio. Facilidades para tomar baño. • Esterilización de jaulas y camas.

Sin barreras adecuadas, los animales se contaminan con microorganismos patógenos. La significación de estas contaminaciones y sus consecuencias dependen de cada especie, de las condiciones de cada colonia y de la situación experimental. La contaminación cruzada entre el hombre y los animales puede constituir un riesgo para ambos grupos, lo que debe preocupar especialmente.

La obtención y conservación de animales de alta calidad sanitaria y microbiológicamente definidos, requiere altos patrones de manejo, barreras físicas y procedimientos adecuados para evitar la entrada de patógenos indeseables. Debemos recordar que cuanto mayor es la categoría del animal, mayores serán los requerimientos de barrera sanitaria. El mayor riesgo de transmisión de patógenos específicos lo constituye la presencia de miembros de la misma especie de menor categoría sanitaria. Por eso, una de las barreras más importante es la separación de animales de diferentes categorías en instalaciones aisladas. También debe recordarse que el hombre es uno de los principales contaminantes de los animales; debe evitarse usar los mismos técnicos para tratar animales de diferente categoría y/o se deben extremar las barreras destinadas a evitar que los cuidadores o investigadores transmitan ciertos patógenos a las colonias.

Cuando se usan animales infectados experimentalmente, debe pensarse también en barreras destinadas a evitar la salida de microorganismos de las áreas infectadas.

Algunos conceptos que vale la pena reforzar son:

a) La barrera total es la suma de las barreras parciales, desde la más sencilla a la más sofisticada. No poder afrontar instalaciones costosas no justifica la falta de empleo de otras barreras simples como, por ejemplo, cerrar con llave las puertas para limitar el acceso de visitantes o del personal no autorizado en determinados sectores, o el lavado frecuente de las manos con procedimientos adecuados.

b) Las barreras sanitarias –consistentes en instalaciones, equipos, procedimientos y rutinas– deben estar validadas.

c) Su utilización debe realizarse siguiendo estrictos Procedimientos Operativos Estandarizados (POE's) escritos, en cuya aplicación deben estar familiarizados y entrenados los usuarios.

d) Los POE's deben estar disponibles en cada área de trabajo a la que corresponden. La dirección del establecimiento o el departamento que corresponda deben contar con un ejemplar completo.

A continuación, una lista de las principales barreras sanitarias y algunos comentarios sobre su instalación y utilización.

Lista de barreras sanitarias

1. Ubicación del bioterio fuera del alcance de peligros sanitarios (separación de instalaciones de diferente grado sanitario, alejamiento de lugares frecuentados por animales salvajes o personas enfermas, etc.) y utilización de sistemas y materiales de construcción que eviten el alojamiento de plagas y faciliten los procesos de sanitización.
2. Diseño del bioterio adecuado, para asegurar el aislamiento de las zonas de animales y de los elementos sanitizados respecto de las zonas con mayor grado de contaminación. Es aconsejable la utilización de código de colores.
3. Filtración adecuada del aire de ingreso y gradiente de presión desde las zonas más limpias a las más contaminadas (presión mayor en corredor limpio) salvo en bioterio de animales infectados, donde la presión menor debe estar en las salas de animales y el aire debe filtarse también a la salida de éstas.
4. Flujo de personas y materiales, destinado a evitar contaminación cruzada.

5. Barreras anti-roedores y anti-insectos en las zonas de acceso (chapas lisas de, aproximadamente, 40 cms. de altura y lámparas ultravioleta con elemento electrocutante).
6. Limitación de la entrada de personas a lo estrictamente indispensable, implementando el uso, en grado progresivo, de trampas con desinfectante para calzado, cambio de calzado, vestimenta de ropa exterior sanitizada, ducha y uso de uniforme estéril, incluyendo máscaras, gorro y guantes.
7. Equipos de desinfección o esterilización (tanques o máquinas de lavado, hervidores, tanques de desinfección, cámaras de vapor fluente, sistemas de sanitización de agua –filtración, cloración, acidificación, etc.–, estufas de esterilización, autoclaves, cámara de esterilización con ácido peracético, salidas por túneles provistos de lámparas ultravioleta o de sistema de fumigación).
8. Uso de insecticidas y desinfectantes adecuados por métodos validados.
9. Cuarentena y monitoreo de todos los animales que llegan del exterior.
10. Monitoreo rutinario del personal y de los animales para identificar portadores de patógenos indeseables.
11. Adiestramiento del personal auxiliar, técnico y profesional en el cumplimiento de las rutinas y procedimientos y en la utilización correcta de las barreras físicas.

Genética y control genético

Afianzando el concepto de reactivo biológico, los aspectos relacionados con la homogeneidad y/o definición genética de los animales son de incuestionable importancia. No es posible utilizar en el laboratorio un animal cuya genética no sea conocida o completamente definida, puesto

que podría responder a condiciones desconocidas por el investigador y sesgar de ese modo sus resultados.

Es requisito universalmente exigido que el animal utilizado en investigación biológica o biomédica sea obtenido de un centro de producción certificado; resulta inadmisible la utilización de animales de granja o de centros de zoonosis para esta clase de investigación, y aún para docencia.

Las características genéticas son relevantes para seleccionar los animales de acuerdo con los objetivos experimentales. Existen distintos tipos de colonias y cepas; por esta razón, es fundamental que el investigador conozca sus diferencias y desarrolle criterios de selección, inclusión o exclusión con relación a sus proyectos.

Es esencial una investigación de las características genéticas para seleccionar los animales, con el fin de elegir los portadores de caracteres consistentes con los objetivos experimentales. Deben considerarse las diferencias conocidas entre especies, colonias o cepas que incluyen: expectativas de vida, anatomía, tamaño corporal, sistemas fisiológicos y metabólicos, requerimientos nutricionales, susceptibilidad a enfermedades, características comportamentales, susceptibilidad a xenobióticos, entre otras. Es muy importante conocer la historia genética completa de los animales antes de comenzar a trabajar.

Tipos genéticos

Con relación a sus tipos genéticos, los animales se clasifican en Colonias Exocriadas (*outbred stocks*), Cepas Endocriadas (*inbred strains*); Híbridos, Colonias Parcialmente Endocriadas, Cepas Endocriadas Apareadas al Azar, Cepas Endocriadas Recombinantes, Cepas Congénicas y Cepas Coisogénicas.

Colonias exocriadas

Mantenidas de forma de evitar el cruzamiento de familiares cercanos. El objetivo es mantener el *pool* y la dispersión genética inicial por tantas generaciones como sea posible. Para esto deben ser mantenidas como colonias cerradas, sin selección y de manera de dar menos del 1% de endocría por generación. El logro de este objetivo dependerá del tamaño de la colonia, el método de elección de los próximos reproductores y el método de cruzamiento que se elija.

Los sistemas de cría recomendados para las colonias exocriadas dependen del tamaño del núcleo de reproducción a saber:

10 - 25 Machos reproductores por generación. Se recomienda:

- Sistemas que maximizan evitar la endocría.

26 - 100 Machos reproductores por generación. Se recomiendan:

- Sistemas que maximizan evitar la endocría.
- Sistemas de cruzamiento rotatorio.

Más de 100 Machos reproductores por generación. Se recomiendan:

- Sistemas de cruzamiento rotatorio.
- Cruzamiento al azar.

Sistemas que maximizan evitar la endocría: están basados en que cada macho reproductor contribuye con un macho y cada hembra reproductora contribuye con una hembra para la próxima generación de reproductores. Estos nuevos reproductores se aparean de forma de evitar el cruzamiento de familiares cercanos.

Sistemas de cruzamiento rotatorio: su objetivo es evitar el cruzamiento de familiares cercanos y asegurar que la próxima generación del núcleo

reproductor provenga de un grupo de padres más amplio que el esperable por azar.

Cruzamiento al azar: el núcleo de reproducción para la próxima generación se elige al azar en la colonia total y son apareados por sorteo, sin tener en cuenta el grado de parentesco. Pueden ocurrir apareamientos de familiares cercanos, lo cual es una desventaja, pero no ocasionará un nivel alto de endocría cuando la colonia es de tamaño considerable.

Cepas endocriadas

Obtenidas a partir de una pareja única, por continuo cruzamiento entre hermanos o entre padres e hijos. Después de 20 o más generaciones con este método, se obtiene un coeficiente de endocría (probabilidad de que dos genes de cualquier *locus* sean idénticos) del 98,6%. Este es el nivel mínimo aceptado internacionalmente para que una cepa sea designada endocriada. Estas cepas deben ser mantenidas por continuo apareamiento del mismo tipo.

En general, la endocría disminuye el rendimiento reproductivo y tiende a disminuir la expectativa de vida. Con frecuencia, el proceso de endocría pone al descubierto anormalidades genéticas encubiertas en las colonias exocriadas.

Híbridos

Existen dos tipos, el F1 y el F2. El primero resulta del cruzamiento de dos cepas endocriadas. Todos ellos son isogénicos (significa que todos los individuos son genéticamente idénticos como gemelos monocigotos) pero heterocigotos en todos los genes en que las cepas progenitoras difieran. En general, son más adaptables a los cambios ambientales que las cepas de sus padres y tienen mejor rendimiento reproductivo. Sólo se usa la primera generación. Los F2 son los animales resultantes del

cruzamiento entre dos híbridos F1. Tienen una base genética mayor que los F1.

Colonias parcialmente endocriadas

Colonias en las cuales el cruzamiento entre hermanos no ha alcanzado aún 20 generaciones.

Cepas endocriadas apareadas al azar

Cepas que tuvieron por lo menos 20 generaciones de cruzamiento entre hermanos, pero no están siendo mantenidas con este tipo de cruzamiento. Esto puede realizarse por algunas generaciones para producir un gran número de animales experimentales por un método como el de las luces de tráfico (*traffic light*).

Cepas endocriadas recombinantes

Producidas a partir de dos cepas endocriadas que se aparean para obtener los híbridos F1. Éstos se vuelven a cruzar para formar el híbrido F2. De estos últimos se seleccionan, al azar, machos y hembras que se endocrían nuevamente, dando origen a múltiples líneas. El reordenamiento y fijación de los genes, originalmente presentes en las cepas progenitoras, ocurre en forma azarosa en las cepas endocriadas recombinantes así obtenidas.

Mutantes

Animales resultantes de una mutación natural o inducida. La variación genética de estos animales es similar a la de la cepa que le dio origen. Generalmente, tienen características reproductivas pobres.

Cepas congénicas

Producidas por retrocruzamiento (*backcrossing*), es decir, cruzamiento repetido de animales portadores de un gen mutante con animales de una cepa endocriada que, normalmente, no es portadora de dicho gen. Se obtienen retrocruzando, por 10 a 12 generaciones, el híbrido F1 portador de la mutante seleccionada con la cepa portadora del fondo genético requerido. La línea así obtenida se mantiene luego en estado homocigótico por cruzamiento entre hermanos. Con este sistema no se transfiere solamente el gen mutante sino, también, una porción cromosomal adyacente cuyo tamaño depende del número de generaciones de retrocruzamiento usado para obtener la cepa congénica.

Cepas coisogénicas

Se obtienen ocasionalmente, cuando ocurre una mutación en una cepa endocriada. En este caso, la mutante sólo difiere de la cepa original en un único *locus*.

Subcepas y desviación genética

Pueden existir diferencias genéticas entre cepas o colonias que comparten el mismo nombre original, pero que fueron mantenidas en diferentes localidades. Por definición, esas cepas se llaman subcepas. También, pueden producirse diferenciaciones genéticas en una cepa o colonia mantenida en una localidad determinada durante un período largo de tiempo y, por eso, es muy importante el monitoreo genético permanente. Cuando se requiere asegurar la preservación de una determinada genética por largos períodos, se puede recurrir a las técnicas de preservación de embriones por congelamiento a muy bajas temperaturas.

Métodos de apareamiento

El sistema elegido dependerá de los hábitos de la especie y del tipo de cría requerida.

Pares monogámicos: consiste en albergar juntos una hembra y un macho en forma permanente. Este método facilita el sistema de registros y permite aprovechar el estro posparto cuando éste ocurre. Es un método más costoso en espacio, trabajo y materiales.

Harenes: un macho se coloca junto con dos o más hembras. Es un método que ahorra machos, pero dificulta los registros. Pueden emplearse dos sistemas:

a) Harén permanente: el grupo se mantiene junto durante su vida reproductiva y se aprovecha el estro posparto, pero se dificultan registros detallados y hay riesgo de sobrepoblación.

b) Retiro de la jaula: las hembras grávidas son retiradas a cajas separadas en el último período de gestación, para facilitar los registros. Se evita la sobrepoblación, pero se pierde la posibilidad de aprovechar el estro posparto.

Los métodos más convenientes para cada especie podrán ser consultados en manuales apropiados.

Control genético

Con el fin de garantizar la autenticidad de las cepas o colonias utilizadas en la investigación o trabajo biológico, las poblaciones de animales de laboratorio deben ser sometidas a un control genético programado. Esto es de la mayor relevancia para el monitoreo de líneas consanguíneas. El propósito es descubrir, en forma temprana, la aparición de mutaciones o errores en la elección de los reproductores. Como los ensayos genéticos son efectuados sobre una muestra pequeña de los individuos y *locus*,