

GUÍA GENERAL PARA EL CUIDADO Y USO DE ANIMALES

PARTE 2

Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia-UNSL



mde

MATERIAL DIDÁCTICO
PARA ESTUDIANTES

2023

**SERIE DIDÁCTICA:
MATERIAL DIDÁCTICO
PARA ESTUDIANTES**

**GUÍA GENERAL PARA EL CUIDADO
Y USO DE ANIMALES
PARTE 2**

Autora:

Dra. María Belén Delsouc

Revisado por:

Dra. Graciela Wendel

Dra. Nadia Bach

Lic. Gerardo Randazzo

Dr. Eduardo Maximiliano Chaves

Méd. Vet. Jorge Perino

Dra. Cecilia Mariana Peralta



FACULTAD DE QUÍMICA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS

2023

RESPONSABLES DE LA PUBLICACIÓN

Decano

Dra. Sebastián ANDUJAR

Secretaria Académica

Dra. Mónica OLIVELLA

*Comisión de la Serie Didáctica:
Material Didáctico para Estudiantes*

Coordinadora

Dra. Yamina DÁVILA

Integrantes

Departamento de Biología

Mg. Karina Ethel MARCHEVSKY

Dra. María Beatriz NÚÑEZ

Departamento de Bioquímica

Dra. Verónica FILIPPA

Dra. Ethelina CARNELUTTI

Departamento de Farmacia

Dra. Cecilia PERALTA

Dra. Ana VICARIO

Departamento de Química

Dr. José A. BOMBASARO

Dra. Cinthya A. MAGALLANES NOGUERA

Edición

Secretaría de Investigación, Vinculación y Extensión

SUMARIO

La publicación periódica Serie Didáctica ha sido creada en el ámbito de la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis (Ordenanza N° 008/07-CD) con el fin de proporcionar material de estudio a los estudiantes de las Carreras de grado impartidas en la Facultad.

Actualmente, la SERIE DIDÁCTICA: MATERIAL DIDÁCTICO PARA ESTUDIANTES (Resolución N°269/16) ofrece guías de Trabajos Prácticos de Laboratorio y de campo, guías de resolución de problemas, material teórico, propuestas de estudio dirigidos y comprensión de textos, entre otros materiales, elaborados por el cuerpo docente de las diferentes Áreas de Integración Curricular de la Facultad. Estas producciones didácticas significan un aporte para cubrir necesidades académicas acordes al enfoque de cada asignatura o que no se encuentran habitualmente en bibliografía específica. Las mismas están disponibles en la página de la UNSL (<http://www.fqbf.unsl.edu.ar/mde.html>) lo que facilita la accesibilidad por parte de los estudiantes, docentes y comunidad educativa en general, garantizando la calidad de la visualización y la amplia difusión del material publicado en este sitio. De igual modo, la Serie Didáctica realiza una extensión invitando a docentes y alumnos de diferentes niveles educativos a participar, crear, producir y utilizar este espacio fomentando así el vínculo entre esta Institución y la comunidad.

En nuestra opinión, es de vital importancia producir y compartir el conocimiento con los estudiantes y la sociedad. De este modo, se tiende a facilitar los procesos de enseñanza y de aprendizaje y la transmisión de una idea directriz de conducta humana y científica, fortaleciendo los vínculos entre docentes-alumnos-conocimientos y sociedad.

Dado que la presente SERIE DIDÁCTICA resulta de la participación de numerosos actores, ante los posibles errores humanos y cambios en la ciencia, ni los editores ni cualquier otra persona que haya participado en la preparación del material didáctico garantizan íntegramente que la información sea precisa o completa.

PRÓLOGO

Desde la Secretaría de Investigación, Vinculación y Extensión de la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia (FQByF) auspiciamos y celebramos la publicación de esta 2º parte de la Guía General para el Cuidado y Uso de Animales.

Esta nueva publicación, no sólo continúa con la excelente calidad de la primera, sino que además agrega temas cruciales para un buen manejo de la práctica de animales de laboratorios, especialmente en roedores.

Es de destacar la claridad y la excelente calidad del material didáctico, lo que demuestra el gran nivel académico de sus autores, además del compromiso y la pasión por la enseñanza del uso responsable de los animales en las prácticas de investigación. Sin lugar a duda, servirá de consulta permanente para nuestros/as docentes e investigadores/as, becarios/as y estudiantes.

Bregamos por más publicaciones de esta calidad, destacando el compromiso en la concientización, responsabilidad y respeto que se debe tener con los animales de investigación.



Dra. María Verónica PEREZ CHACA
Secretaria de Investigación, Vinculación y Extensión (SIVE)
Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia
Universidad Nacional de San Luis

PRESENTACIÓN DE LA GUÍA GENERAL PARA EL CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA, UNSL - PARTE 2

Desde sus inicios, el CICUA-FQByF-UNSL ha velado por un cuidado y uso responsable y humanitario de los animales de experimentación solicitados por los miembros de nuestra Institución. Con base en ello, surge la necesidad de elaborar una Guía General para el Cuidado y Uso de los Animales, a partir de la recopilación de información de diferentes fuentes bibliográficas nacionales e internacionales.

En 2022 se completó la publicación de la Parte 1 de la Guía, donde se abordaron diversos temas como: estándares de higiene y seguridad en el bioterio, ética en el uso de animales, manejo y cuidados básicos de ratones y ratas, entre otros. El presente documento corresponde a la Parte 2, referida particularmente a la administración de sustancias y métodos de anestesia, analgesia y eutanasia recomendados para ratones y ratas. La información brindada se considera sumamente necesaria para ser aprehendida por cualquier persona que utilice animales de experimentación, dado que promueve el trato humanitario de los mismos y contribuye a obtener resultados confiables y reproducibles, al mismo tiempo que facilita considerablemente el trabajo del grupo de investigación. Junto con la Parte 1, pretende convertirse en un instrumento de referencia para todas aquellas personas de nuestra institución que requieran ratas o ratones en el desempeño de su labor.

Autora:

Dra. María Belén Delsouc

Revisado por:

Dra. Graciela Wendel

Dra. Nadia Bach

Lic. Gerardo Randazzo

Dr. Eduardo Maximiliano Chaves

Méd. Vet. Jorge Perino

Dra. Cecilia Mariana Peralta

Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA), FQByF-UNSL

ÍNDICE

Administración de Sustancias 1

Vías de Administración de Sustancias en Ratones y Ratas 2

Vía Oral..... 3

Vía Intradérmica..... 4

Vía Intravenosa 5

Vía Subcutánea 7

Vía Intramuscular..... 8

Vía Intraperitoneal 9

Anestesia y Analgesia 10

Anestésicos y Analgésicos Usados en Ratones y Ratas..... 12

Manejo de Eventos Críticos 17

Eutanasia 17

Métodos Utilizados para la Eutanasia de Ratones y Ratas..... 22

Bibliografía 24

Administración de Sustancias

Cuando se trabaja con animales de experimentación, varios procedimientos como la anestesia, la eutanasia, los estudios de seguridad y farmacología, entre otros, suelen requerir la administración de sustancias y, para ello, es importante tener en cuenta diferentes aspectos. Deben conocerse las características fisicoquímicas de la sustancia (y/o su vehículo), la tasa de absorción, el volumen a administrar, la frecuencia de dosificación esperada y la especie animal (características anatómicas, fisiológicas y de comportamiento). Asimismo, se debe considerar el estado nutricional de los animales y el momento de aplicación de la dosis respecto al ritmo circadiano (oscilaciones en el comportamiento, la fisiología y el metabolismo que ocurren a lo largo de las 24 horas del día), ya que pueden influir en la farmacología o toxicidad de una sustancia. Cualquier agente debe administrarse a temperatura ambiente o a una temperatura equivalente a la temperatura corporal del animal para evitar molestias o shock. Cabe señalar que algunas vías de administración son más estresantes que otras, por lo que se debe elegir la vía que menos interactúa con el propósito del experimento (Morton *et al.*, 2001). Además, es indispensable que la persona responsable de los procedimientos esté capacitada en técnicas de manipulación y sujeción, cuente con los materiales necesarios y sea consiente de todos los posibles efectos (deseados y adversos) relacionados con la administración.

La administración siempre debe realizarse de la mejor forma posible para reducir al máximo el número de animales requeridos, evitar sufrimiento innecesario, minimizar o evitar efectos indeseados y obtener resultados de calidad para una interpretación precisa de los mismos.

En general, la administración de sustancias se realiza por diferentes vías que pueden clasificarse en (Morton *et al.*, 2001; Turner *et al.*, 2011):

- **Tópica:** la sustancia se administra directamente sobre la piel o las mucosas. El grado de absorción depende del área superficial en la que se aplica la sustancia, su concentración, la superficie de la piel que debe estar limpia e intacta, y el tiempo que permanece la sustancia en contacto con este órgano. Es importante tener en consideración el potencial de toxicidad sistémica, evitar aplicar sustancias irritantes o cáusticas y evitar que los animales ingieran la sustancia.
- **Inhalatoria:** la sustancia se administra en forma de aerosol por la nariz o la boca y alcanza los pulmones durante la inhalación respiratoria.
- **Enteral:** la sustancia alcanza su objetivo a través del tracto gastrointestinal (administración orogástrica o nasogástrica), por lo que se deben tener en cuenta

las barreras a traspasar y las características del fármaco para evitar irritación gástrica e inactivación a nivel gástrico-hepático.

→ **Parenteral:** la sustancia se administra por medio de una inyección que puede ser *intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular*. Al no ingresar por el tracto digestivo, se evita el metabolismo hepático. También se evita parte de la imprevisibilidad asociada con los procesos de absorción enteral.

Vías de Administración de Sustancias en Ratones y Ratas

La administración de sustancias en ratones y ratas requiere de una cuidadosa consideración y planificación, además de conocimiento y experiencia en los métodos de manipulación y sujeción, un tema que se aborda en la Parte 1 de la Guía General para el Cuidado y Uso de Animales (Delsouc *et al.*, 2021).

En esta sección, se darán a conocer las vías más empleadas en investigación e incluye la administración oral, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, e intramuscular. Información sobre los volúmenes a administrar y el calibre y longitud de las agujas recomendado para ratones y ratas, según la vía de administración, se resume en la **Tabla 1**:

Tabla 1. Volúmenes máximos a administrar, calibre y longitud de las agujas recomendado según las vías habituales de administración

		Ratón		Rata	
		Volumen	Calibre y longitud de aguja	Volumen	Calibre y longitud de aguja
Enteral	Oral (sonda orogástrica)	0,01 mL/g	20-22 G	0,01 mL/g	16-20 G
Parenteral	Intradérmica	0,05-0,1 mL/sitio	<26 G 0,5 cm	0,05-0,1 mL/sitio	<26 G 0,5 cm
	Intravenosa	0,005 mL/g - 0,025 mL/g*	<25 G 0,75 a 1 cm	0,005 mL/g - 0,02 mL/g*	<23 G 0,75 a 1 cm
	Subcutánea	0,01 mL/g	25 G 0,5 a 1 cm	0,005 mL/g	21-25 G 0,5 a 1 cm
	Intramuscular	0,00005 mL/g/sitio	27 G 0,5 a 0,75 cm	0,0001 mL/g/sitio	25 G 0,5 a 0,75 cm
	Intraperitoneal	0,02 mL/g	25-27 G 0,75 a 1 cm	0,01 mL/g	21-25 G 0,75 a 1 cm

Nota. *El primer número es el volumen dado en forma de bolo intravenoso durante aproximadamente 1 minuto. El segundo número es el volumen que se puede administrar lentamente durante 5 a 10 minutos. G corresponde a Gauge y es la medida del diámetro interior de las aguja. Datos extraídos de: Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME, s.f.), Machholz *et al.* (2012) y Morton *et al.* (2001).

Vía Oral

La sustancia se puede administrar por inclusión en alimentos o agua de bebida, dependiendo de su estabilidad en condiciones ambientales normales, o se puede utilizar una sonda orogástrica en los casos en que un producto no sea muy palatable (tiene mal sabor) o cuando se necesita una dosificación más precisa (Turner *et al.*, 2011). El volumen máximo a administrar en ratones es de 100 a 200 μ l y en ratas de 300 a 400 μ l (IBYME, s.f.). La administración de volúmenes mayores puede provocar distensión severa del estómago y reflujo esofágico, lo cual puede afectar la absorción de la sustancia.

Previo al procedimiento, no se recomienda restringir la comida normal durante periodos largos (más de 4 horas). Las razones del ayuno deben estar debidamente justificadas ya que puede cambiar varios parámetros fisiológicos. Cabe señalar que el ayuno nocturno de ratones y ratas no es comparable al ayuno nocturno de los humanos, porque estos roedores son más activos durante la noche y tienen una tasa metabólica más alta (Jensen *et al.*, 2013).

Materiales necesarios:

- Sonda orogástrica (**Figura 1**)
- Jeringas estériles de 1,2 - 5 mL, según el peso del animal
- Vaselina o parafina médica
- Hisopos
- Sustancia a administrar (fármaco y vehículo)
- Elementos de protección personal (EPP)

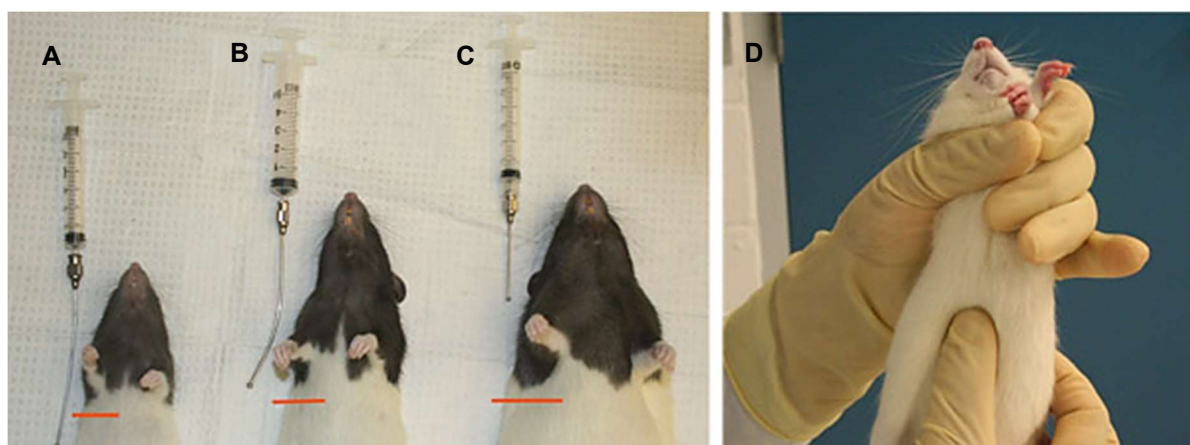


Figura 1. Selección de la sonda apropiada. A) Sonda demasiado larga: mayor riesgo de perforación. B) Sonda de tamaño adecuado. C) Sonda demasiado corta: mayor riesgo de broncoaspiración, D) Palpación de la última costilla para determinar el tamaño adecuado de la sonda. Adaptado de "Manual restraint and common compound

administration routes in mice and rats” (p. 6), por E. Machholz *et al.*, 2012, *Journal of Visualized Experiments*, 67.

Procedimiento:

1. Cargar la jeringa con el volumen de sustancia a administrar. A continuación, acoplar la sonda a la jeringa y presionar ligeramente el émbolo para que la sustancia alcance el extremo distal, evitando así la introducción de aire en el estómago.
2. Lubricar la sonda con vaselina o parafina médica utilizando un hisopo para facilitar el progreso de la misma.
3. Inmovilizar al animal empleando la técnica de pinzamiento y colocarlo en posición vertical de manera que el esófago quede en línea recta.
4. Introducir la sonda lateral a la lengua, en forma lenta y suave. Permitir que el animal exponga la lengua por acción refleja. No continuar con la maniobra si hay resistencia. Ante esta situación, retirar la sonda y volver a intentarlo.
5. Una vez esté ubicada la sonda, iniciar la administración de la sustancia lentamente, observando si hay algún tipo de reacción anormal en el animal.
6. Terminada la instilación, retirar la sonda del animal. En caso de sentir resistencia en la extracción, realizar movimientos giratorios leves de la jeringa. Cuando la sonda sea retirada, observar al animal, su patrón respiratorio y si se desarrollan ruidos respiratorios anormales (“gorjeos” o “carraspeos”). Estos signos pueden indicar broncoaspiración y, en estos casos, se debe eutanzar al animal.

Vía Intradérmica

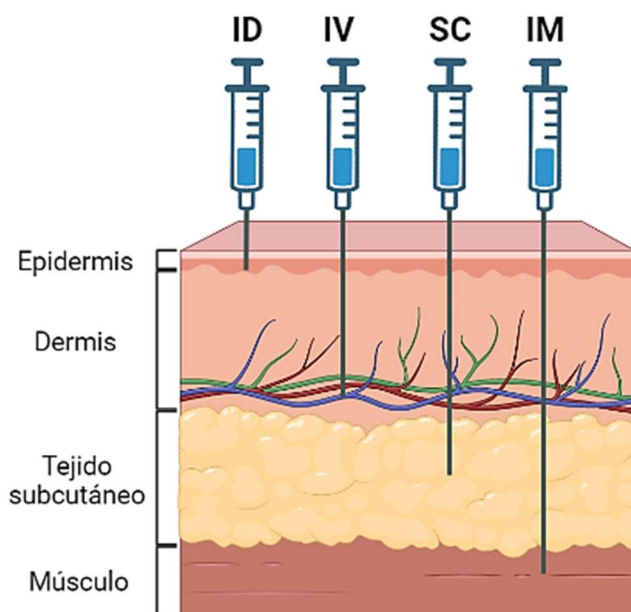
La inyección se hace normalmente en la región dorsal (lomo) del animal, entre las capas exteriores de la piel (**Figura 2**). El número máximo de sitios de inoculación no debe exceder de 6 por animal. Dichos sitios deben estar lo suficientemente alejados entre sí para evitar la coalescencia (Morton *et al.*, 2001).

Materiales necesarios:

- Algodón o gasa
- Alcohol etílico al 70%
- Jeringa y aguja estériles, de tamaño apropiado
- Sustancia a administrar
- EPP
- Descartadores para residuos patológicos y cortopunzantes

Procedimiento:

1. Colocar al animal sobre una superficie segura. Previamente, se recomienda afeitar la zona de punción al menos 1 hora antes.
2. Desinfectar la zona a inocular con un algodón embebido en alcohol etílico al 70%.
3. Insertar cuidadosamente la aguja casi en paralelo a la superficie de la piel, 2-3 mm dentro de ella. Si se produce una repentina pérdida de resistencia a la inserción de la aguja, puede deberse al paso a la capa subcutánea y el procedimiento debe realizarse nuevamente.
4. Inyectar la sustancia lentamente y de manera constante. Se debe observar la formación de un habón (pápula o bulto en forma de haba que aparece en la piel).
5. Después de la inoculación, realizar una ligera rotación de la aguja justo antes de extraerla para ayudar a minimizar la pérdida de la sustancia inyectada.



Created in BioRender.com 

Figura 2. Vías de administración de sustancias. Se representan las vías intradérmica (ID), intravenosa (IV), subcutánea (SC) e intramuscular (IM). Elaboración propia, creada en BioRender.com

Vía Intravenosa

Esta vía asegura la consecución de la máxima exposición al plasma, de la forma más rápida posible, evitando la posibilidad de eliminación por el metabolismo preenterohepático.

No se deben aplicar medicamentos con vehículo oleoso o sustancias irritantes (Morton *et al.*, 2001; Turner *et al.*, 2011).

Materiales necesarios:

- Algodón o gasa
- Alcohol etílico al 70%
- Agua tibia (temperatura no superior a 43 °C)
- Jeringa y aguja estériles, de tamaño apropiado
- Sustancia a administrar
- EPP
- Cepo
- Descartadores para residuos patológicos y cortopunzantes

Procedimiento:

1. Inmovilizar al animal colocándolo dentro de un cepo.

Nota: El dispositivo debe estar siempre limpio antes de introducir un animal, para evitar infecciones cruzadas o estrés inducido por feromonas.

2. Sumergir la cola del animal en agua tibia (30 segundos aproximadamente) para favorecer la dilatación de los vasos sanguíneos.

Alternativa: colocar al animal durante 30 minutos en un ambiente más cálido (por ejemplo, a 28-30 °C).

3. Visualizar la vena lateral de la cola y limpiar la zona de punción con un algodón embebido en alcohol etílico al 70 % (con un movimiento hacia abajo, desde la base hasta la punta).
4. Introducir la aguja con el bisel hacia arriba, casi paralelo al vaso sanguíneo (**Figura 3**).
5. Retraer el émbolo cuidadosamente antes de inocular la sustancia para verificar que se encuentra dentro del vaso. Si la aguja no está en el lugar correcto, no se visualizará sangre en el cono de la misma y habrá fuerte resistencia al inyectar.
6. Una vez ubicada la aguja en el lugar correcto, inyectar lentamente la sustancia.
7. Retirar la aguja y aplicar presión en el sitio de punción con algodón seco, durante aproximadamente 20 segundos, para asegurar buena hemostasia.
8. Finalmente, retirar al animal del cepo y colocarlo en la caja.

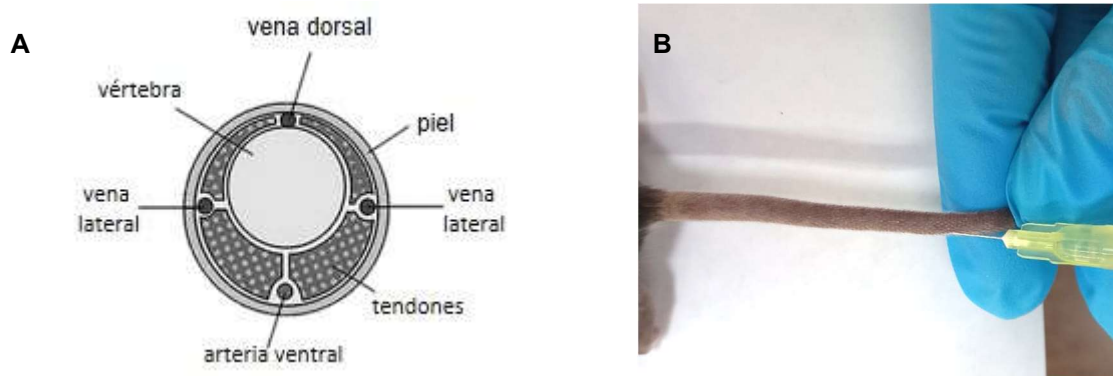


Figura 3. Administración de sustancia vía intravenosa. A) Diagrama de la vista transversal de la cola de un ratón. Adaptado de *The Laboratory Rat* (p. 491), por G.J. Krinke, 2000, Academic Press. B) Procedimiento de inoculación en la vena lateral de la cola de un ratón anestesiado. Elaboración propia.

Vía Subcutánea

Esta vía proporciona una lenta liberación de la sustancia, evitando el metabolismo de primer paso por el hígado. El lugar de elección para la inyección es la región escapular, donde la aguja se inserta en la piel paralelo a la columna vertebral (Morton *et al.*, 2001). Si los animales han de recibir múltiples inyecciones, un sitio alternativo es el flanco.

Materiales necesarios:

- Algodón o gasa
- Alcohol etílico al 70%
- Jeringa y aguja estériles, de tamaño apropiado
- Sustancia a administrar
- EPP
- Descartadores para residuos patológicos y cortopunzantes

Procedimiento:

1. Colocar al animal sobre una superficie segura.
2. Desinfectar la zona a inocular (pliegue nugal) con un algodón embebido en alcohol etílico al 70%.
3. Sujetar el pliegue nugal (entre las escápulas) con los dedos índice y pulgar, haciendo una "tienda de campaña" al elevar la piel.
4. Insertar la aguja con el bisel hacia arriba, paralelo a la columna vertebral (**Figura 4**), hasta sentir la pérdida de resistencia; de lo contrario, la inoculación podría resultar intradérmica.
5. Inyectar la sustancia lentamente con un movimiento constante.
6. Después de la inoculación, retirar la aguja y aplicar presión suave en el sitio de punción para evitar el reflujo de la sustancia administrada.

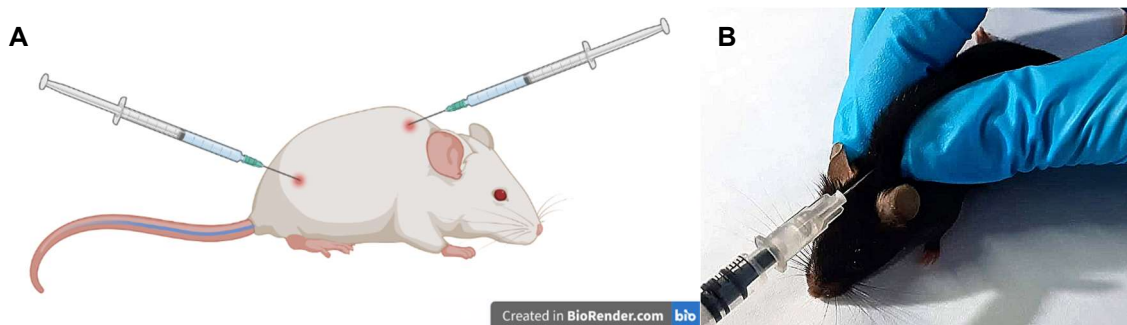


Figura 4. Administración de sustancia vía subcutánea. A) Posibles sitios de punción en roedores. Creado en BioRender.com. B) Sujeción del ratón durante la administración subcutánea. Elaboración propia.

Vía Intramuscular

Esta vía no es muy usada debido a la poca masa muscular del ratón o la rata y el posible daño que se puede ocasionar a los nervios mayores (Turner *et al.*, 2011). La técnica es considerada dolorosa y puede producir cojera temporal.

Como máximo se pueden realizar hasta dos inoculaciones por día (una en cada pata trasera del animal), y no deben administrarse sustancias irritantes porque pueden causar necrosis tisular (Morton *et al.*, 2001).

Se recomienda la participación de dos personas para ejecutar la técnica sin dificultad, especialmente si se trabaja con ratas: una para sujetar al animal y otra para realizar la inoculación (**Figura 5**).

Materiales necesarios:

- Algodón o gasa
- Alcohol etílico al 70%
- Jeringa y aguja estériles, de tamaño apropiado
- Sustancia a administrar
- EPP
- Descartadores para residuos patológicos y cortopunzantes

Procedimiento:

1. Tras inmovilizar al animal, sujetar firmemente la pata a inocular y realizar la antisepsia de la zona con un algodón embebido en alcohol etílico al 70%.
2. Introducir la aguja en la parte delantera del muslo o en la masa muscular lateral (alejado de vasos sanguíneos y nervios mayores), con el bisel hacia arriba y perpendicular al lugar de punción. Profundidad de la aguja: solo bisel en ratón y hasta 0,5 cm en rata.
3. Retraer el émbolo de la jeringa antes de inocular para verificar que no se haya incidido en un vaso sanguíneo.
4. Inyectar la sustancia lentamente y, luego, retirar la aguja con cuidado.

5. Masajear la zona para distribuir la sustancia inoculada.



Figura 5. Inyección intramuscular en la rata. Adaptado de *Intramuscular Injection in the Rat* [Fotografía], por Research Animal Training, 2021, FLAIRE Consultants (<https://researchanimaltraining.com/articles/intramuscular-injection-in-the-rat/>).

Vía Intraperitoneal

Implica una inyección en la cavidad peritoneal a través de la pared abdominal. Se utiliza para administrar volúmenes relativamente grandes de sustancias solubles (como los analgésicos inyectables), cuando se necesita que se absorban rápidamente y cuando la vía oral o la vía intravenosa no son convenientes.

Es importante tener en cuenta: 1) no administrar sustancias irritantes por esta vía, 2) la administración rápida de alguna sustancia puede causar daños y hemorragia debido a la presión interna, 3) esta vía no se recomienda para hembras preñadas ya que la aguja puede penetrar el útero (Morton *et al.*, 2001).

Materiales necesarios:

- Algodón o gasa
- Alcohol etílico al 70%
- Jeringa y aguja estériles, de tamaño apropiado
- Sustancia a administrar
- EPP
- Descartadores para residuos patológicos y cortopunzantes

Procedimiento:

1. Aplicar la técnica de pinzamiento para una correcta sujeción con restricción de movimiento. En el caso de la rata, se deben sujetar las patas traseras (se requerirá de otra persona para la inoculación).

2. Colocar al animal levemente con la cabeza hacia abajo para evitar la punción de los intestinos.
3. Realizar la antisepsia del sitio de punción: zona baja del abdomen, preferentemente en el cuadrante inferior derecho del animal para disminuir el riesgo de inyectar en ciego. Para ello, utilizar un algodón embebido en alcohol etílico al 70%.
4. Insertar la aguja con el bisel hacia arriba, formando un ángulo de 30° entre el abdomen del animal y la mano de la persona que sostiene la jeringa (**Figura 6**) para incidir primero en el plano subcutáneo, luego inclinar la aguja a 90° para incidir en el peritoneo visceral; profundidad de la aguja: 5 mm en ratón y hasta 1 cm en rata.
5. Inyectar la sustancia lentamente y, finalizada la administración, retirar la aguja.

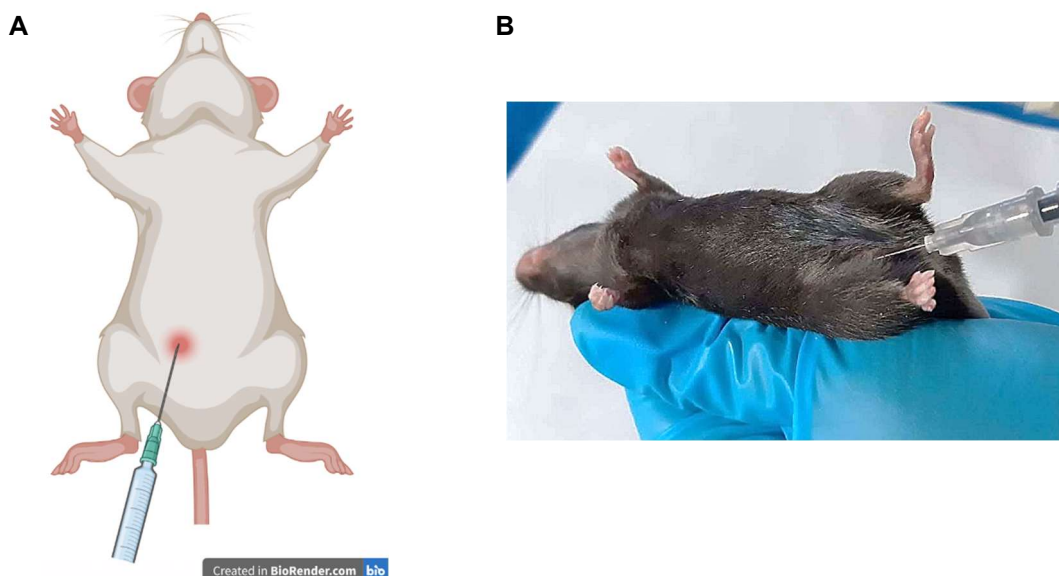


Figura 6. Administración de sustancia vía intraperitoneal. A) Sitio de punción. Creado en BioRender.com. B) Sujeción del ratón durante la administración intraperitoneal. Elaboración propia.

Anestesia y Analgesia

La anestesia es una de las técnicas más comunes en la experimentación animal. Consiste en la administración de uno o más fármacos para producir un estado de depresión de la corteza cerebral que impide la llegada o reconocimiento de estímulos sensoriales, ya sean dolorosos o no. Con ello se pretende:

- Facilitar el manejo del animal y la realización de procedimientos considerados dolorosos e imposibles de realizar con el animal consciente.

- Brindar un trato humanitario a los animales, minimizando el sufrimiento asociado a su manipulación y evitando situaciones de angustia o ansiedad. Incluso se recomienda su uso (siempre que sea posible) antes de determinados métodos de eutanasia.
- Minimizar las consecuencias negativas de una cirugía o procedimiento sobre la fisiología del animal (Álvarez Gómez de Segura, s.f.).

La selección de fármacos depende del tipo y grado de dolor a manejar, la especie y edad del animal, los posibles efectos sobre el órgano o sistema específico y la duración de la intervención quirúrgica o procedimiento experimental. Para tener en cuenta, la tendencia general indica que los animales pequeños tienen una tasa metabólica específica elevada. En este sentido, cuando menor es la especie, mayor es la dosis en mg/kg de peso corporal a utilizar. No se puede simplemente extrapolar la dosis de un anestésico de una especie a otra, porque el resultado puede no ser el esperado. Sobre la base de lo antes mencionado, se puede decir que el tipo de anestésico, la dosis y la vía de administración, es un tema que requiere una revisión bibliográfica y el importante asesoramiento del médico veterinario del Bioterio.

Según la pérdida de sensibilidad, la anestesia se puede diferenciar en: **local**, donde solo una región del cuerpo del animal no es capaz de percibir estímulos sensoriales, o **general**, donde el animal permanece inconsciente. Los efectos componentes de la anestesia general son: 1) *Hipnosis* (o pérdida de conciencia): implica que el animal está ausente de su entorno circundante; 2) *Analgesia*: ausencia de percepción del dolor en el animal, que no afecta a la conciencia; 3) *Bloqueo de la actividad refleja* (o protección neurovegetativa): impide las respuestas del sistema nervioso autónomo que incluyen alteraciones en la frecuencia y el ritmo cardíaco, disminución de secreciones, etc., permitiendo mantener la estabilidad durante la anestesia; 4) *Relajación muscular*: que va desde un grado moderado, proporcionado por la mayoría de los anestésicos, hasta la parálisis proporcionada por agentes bloqueantes neuromusculares. En animales de laboratorio, la relajación muscular producida por casi todos los anestésicos es suficiente para la mayoría de los procedimientos quirúrgicos. Un anestésico ideal incluye los cuatro componentes mencionados anteriormente de manera estable, sin afectar otras funciones orgánicas, y además debe ser fácil de administrar, reversible, de bajo costo y seguro para el animal y el personal (Álvarez Gómez de Segura, s.f.).

En referencia a los analgésicos (opioides, antiinflamatorios no esteroideos, entre otros), cada vez hay más literatura que avala que su uso para tratamiento del dolor posquirúrgico o el dolor por traumatismo aporta más ventajas que inconvenientes, tanto desde el punto de vista ético o de bienestar animal como desde el punto de vista científico o de fiabilidad de los resultados (el dolor que no se alivia puede tener profundas consecuencias fisiológicas negativas, que pueden alterar los resultados de la investigación). En términos generales, se

debe asumir que los procedimientos que causan dolor en los seres humanos también causan dolor en los animales de experimentación, a menos que se sepa o establezca lo contrario. Por consiguiente, es esencial que el personal que manipule a los animales sepa identificar indicadores de dolor fisiológicos y de comportamiento específicos de la especie a utilizar (**Tabla 2**), para tomar las medidas necesarias como, por ejemplo, considerar analgesia, evaluar refinamiento de una técnica, finalizar el procedimiento.

Tabla 2. Signos indicativos de dolor en roedores

<i>Signos de comportamiento</i>	<i>Indicadores fisiológicos</i>
Nivel reducido de actividad espontánea	Presión sanguínea elevada
Postura encorvada (arqueamiento dorsal)	Ritmo cardíaco elevado
Piloerección	Frecuencia respiratoria elevada
Aseo reducido	Cambios en la temperatura corporal
Ojos entrecerrados	Pérdida de peso
Mayor agresividad cuando se manipula	
Aislamiento social	
Reducción de la ingesta de agua/alimento	
Temblores, espasmos (en ratas)	
Secreciones de porfirina (en ratas)	

Nota. Información recopilada y adaptada de Kohn *et al.* (2007).

Actualmente, dada la gran variedad de fármacos disponibles, es más factible encontrar uno que no interfiera en los resultados experimentales y, además, existe suficiente información bibliográfica para ajustar las dosis a utilizar según la especie de interés. Cabe señalar que es imperativo que los fármacos a utilizar, así como la vía de administración (incluyendo materiales a utilizar), sean evaluados por un CICUAL.

Anestésicos y Analgésicos Usados en Ratones y Ratas

Como se mencionó anteriormente, hay múltiples agentes farmacológicos disponibles para controlar el dolor en animales de investigación. Estos agentes tienen diferentes mecanismos y duración de acción, así como diferentes potencias para aliviar el dolor. En **Tabla 3** se dan a conocer los anestésicos usados en ratones y ratas, con detalle de las dosis recomendadas y vía de administración.

Tabla 3. Anestésicos usados en ratones y ratas

	<i>Dosis para Ratón</i>	<i>Dosis para Rata</i>	<i>Vía</i>
Anestesia local			
Lidocaína (1-2 horas de duración)	Diluir al 0,5 %, no exceder la dosis total de 7 mg/kg	Diluir al 0,5 %, no exceder la dosis total de 7 mg/kg	SC
Bupivacaína (4-8 horas de duración)	Diluir al 0,25 %, no exceder la dosis total de 8 mg/kg	Diluir al 0,25 %, no exceder la dosis total de 8 mg/kg	SC
Anestesia de corta duración			
Propofol (5-10 minutos)	12-26 mg/kg	10 mg/kg	IV
Tiopental sódico (20-25 minutos)	30-40 mg/kg	30 mg/kg	IV
Anestesia de media duración (20-60 minutos)			
Ketamina/Diazepam	100/5 mg/kg	80/10 mg/kg	IP
Ketamina/Xilacina	100/10 mg/kg	80/10 mg/kg	IP o IM
Ketamina/Xilacina/Acepromazina	50/5/1 mg/kg	50/5/1 mg/kg	IP o IM
Ketamina/Medetomidina	75/1 mg/kg	75/0,5 mg/kg	IP
Pentobarbital	40-60 mg/kg	30-40 mg/kg	IP
Anestesia de cualquier duración			
Isoflurano	3-4% para inducción 1,5-3% para mantenimiento		Inhalatorio

Nota. SC, Subcutáneo; IP, Intraperitoneal; IM, Intramuscular; IV, Intravenoso. Datos extraídos y adaptados de: Álvarez Gómez de Segura (s.f.), Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC, 2020) y Vogler (2006).

Descripción general de cada uno de los agentes anestésicos:

- **Lidocaína:** anestésico local del tipo amida, de inicio rápido pero de corta duración. Bloquea tanto la iniciación como la conducción de los impulsos nerviosos al disminuir la permeabilidad de la membrana neuronal a los iones. Las concentraciones plasmáticas altas pueden causar efectos cardiovasculares (hipotensión, arritmias) y depresión del sistema nervioso central (SNC) seguida de convulsiones.

- **Bupivacaína:** anestésico local del tipo amida, de inicio lento pero de acción prolongada. Actúa bloqueando canales de sodio, impidiendo la propagación del impulso nervioso. Las concentraciones plasmáticas altas pueden causar efectos cardiovasculares (hipotensión, arritmias) y depresión del SNC seguida de convulsiones.
- **Propofol:** anestésico general intravenoso de corta duración, con acciones hipnóticas, sedantes y amnésicas (carece de efecto analgésico). Su diana principal son los receptores A del ácido γ -aminobutírico (GABA), de los cuales es un agonista. Disminuye la presión arterial media, el flujo sanguíneo cerebral, la presión intracraneal y el metabolismo cerebral. Puede producir ligeros cambios en la frecuencia cardíaca y depresión ventilatoria. Tiene poco efecto sobre la función renal y hepática, y sobre las glándulas endocrinas.
- **Tiopental sódico:** anestésico barbitúrico de acción rápida y de corta duración. Induce hipnosis y sedación, no analgesia. Aumenta la respuesta inhibitoria al GABA, disminuye las respuestas al glutamato y deprime directamente la excitabilidad neuronal. Es anticonvulsivante. Disminuye el metabolismo cerebral, el flujo sanguíneo cerebral y la presión intracraneal, manteniendo la presión de perfusión cerebral. Al igual que propofol, puede causar depresión cardiovascular y respiratoria.
- **Ketamina:** anestésico general de rápida acción, con conservación del reflejo faríngeo-laríngeo y estímulo cardiorrespiratorio. Actúa como antagonista no competitivo del receptor ácido N-metil-D-aspartico (NMDA). Produce sedación, inmovilidad, amnesia y marcada analgesia. El estado anestésico producido por ketamina ha sido denominado anestesia disociativa debido a que interrumpe, de forma selectiva, las vías de asociación cerebral antes de producir el bloqueo sensorial somestésico. Se recomienda su uso en combinación con otros agentes para lograr una relajación y analgesia óptima.
- **Diazepam:** benzodiazepina de acción prolongada. Facilita la neurotransmisión fisiológica de carácter inhibitorio mediada por GABA en distintas zonas del SNC, provocando un efecto ansiolítico, sedante, anticonvulsivante y miorrelajante. La miorrelajación se produce a nivel central. Su administración no produce bloqueo del sistema nervioso periférico autónomo ni provoca manifestaciones extrapiramidales. Como reacciones adversas se ha informado: hipotensión, hipertensión; bradicardia, isquemia de miocardio, taquicardia; hiperglucemia, hipoglucemia; agitación; hipertermia, depresión respiratoria.
- **Xilacina:** potente sedante, miorrelajante y analgésico no narcótico. La actividad sedante y analgésica se relaciona con una depresión del SNC. El efecto relajante muscular está basado en la inhibición de la transmisión intraneural de los impulsos en

el SNC. Los posibles efectos adversos son: bradicardia, bloqueo cardíaco e hipotensión arterial aguda.

- **Acepromacina:** fármaco antipsicótico derivado de la fenotiazina. Ejerce su principal actividad al bloquear los receptores dopaminérgicos, induciendo disminución de la actividad motora espontánea, reducción de la respuesta a los reflejos condicionados, vasodilatación periférica e hipotensión.
- **Medetomidina:** compuesto sintético racémico de dos estereoisómeros que actúa como relajante muscular de acción central, anticonvulsivante y analgésico potente. Agonista del adrenoreceptor α_2 altamente selectivo en neuronas presinápticas. La estimulación de estos receptores conduce a una disminución en la liberación de norepinefrina desde las neuronas presinápticas con inhibición de la activación pos-sináptica, atenuando la excitación del SNC por efecto simpaticolítico.
- **Pentobarbital:** barbitúrico con propiedades sedantes, hipnóticas y anticonvulsivas. Como el resto de los barbitúricos, actúa como depresor no selectivo del SNC y su acción parece estar relacionada con la capacidad de aumentar o mimetizar la acción inhibitoria sináptica del GABA. En dosis altas presenta actividad anticonvulsiva. Actualmente, se considera un fármaco obsoleto dado las alternativas existentes en el mercado y la baja calidad de la anestesia que produce, caracterizada por una analgesia deficiente y una depresión cardiovascular y respiratoria elevada.
- **Isoflurano:** anestésico inhalatorio halogenado metil etil éter no inflamable. Produce depresión cardiovascular y respiratoria de manera dosis-dependiente. Prácticamente, se elimina en su totalidad por el pulmón por lo que no experimenta metabolismo hepático. Se recomienda administrarlo por medio de un vaporizador perfectamente calibrado en un circuito anestésico apropiado, pues los niveles del anestésico pueden alterarse de manera fácil y rápida. Este agente debe ser administrado en oxígeno o en mezclas oxígeno/óxido nitroso.

Tras abordar los anestésicos, en **Tabla 4** se dan a conocer los analgésicos usados en roedores, con detalle de las dosis recomendadas, vía de administración y duración.

Tabla 4. Analgésicos usados en roedores

Agente	Dosis (mg/kg)	Vía	Duración
Ratón			
Buprenorfina	0,05-0,1	SC	6-12 h

Tramadol	5-40	SC o IP	No determinado
Carprofeno	2-5	SC	12-24 h
Meloxicam	1-5	SC o PO	12 h
Ketoprofeno	2-5	SC	24 h
Rata			
Buprenorfina	0,01-0,1	SC o IM	8-12 h
Tramadol	5-20	SC o IP	No determinado
Carprofeno	2-5	SC	24 h
Meloxicam	1-2	SC o PO	12-24 h
Ketoprofeno	2-5	SC	24 h

Nota. SC, Subcutáneo; IP, Intraperitoneal; IM, Intramuscular; PO, Oral.
 Datos extraídos y adaptados de Foley *et al.* (2019).

Descripción general de cada uno de los agentes analgésicos:

- **Buprenorfina:** agonista/antagonista opiáceo de potencia moderada, que se une a los receptores μ y kappa del cerebro. Uno de los analgésicos más utilizado en roedores.
- **Tramadol:** agente sintético de acción central, que actúa como agonista de los receptores opioides. Además, inhibe la recaptación de norepinefrina y serotonina.
- **Carprofeno:** antiinflamatorio no esteroide (AINE), derivado del ácido propiónico. Actúa como inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa (COX)-2, inhibiendo a su vez la producción de prostaglandinas. Tiene propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas.
- **Meloxicam:** AINE derivado del ácido enólico. Al igual que carprofeno, actúa como inhibidor selectivo de la COX-2 y posee cualidades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas. De absorción algo lenta aunque casi completa tras su administración oral.
- **Ketoprofeno:** AINE derivado del ácido propiónico, con buena biodisponibilidad oral y propiedades antiinflamatorias (menor que la de los otros AINE), analgésicas y antipiréticas. Actúa como inhibidor selectivo de la COX-1.

Manejo de Eventos Críticos

Luego de la administración de fármacos anestésicos, siempre se debe monitorear a los animales prestando especial atención a la frecuencia respiratoria (entre 55-100 respiraciones/min), la frecuencia cardíaca (entre 300-500 latidos/min), la temperatura corporal (entre 36-38 °C) y el color de la membrana mucosa (rosado, no blanco ni azulado). En caso de sobredosis de anestésico y/o parada respiratoria o cardíaca, se pueden realizar algunas maniobras, por ejemplo: resolver la posible hipotermia, administrar oxígeno con una mascarilla, realizar compresiones de la cavidad torácica (masaje cardíaco externo utilizando los dedos pulgar e índice) y utilizar fármacos de emergencia (**Tabla 5**).

Tabla 5. Fármacos de emergencia utilizados en roedores

Fármaco	Dosis	Vía	Comentarios
Doxapram	5-10 mg/kg	IV o IM	Para estimular la actividad respiratoria. La administración puede repetirse cada 15 min en caso de ser necesario.
Adrenalina	0,01-0,04 mg/kg	IV	Para tratamiento del paro cardíaco. Se puede repetir la administración cada 3-5 min.

Nota. IV, Intravenoso; IM, Intramuscular. Datos extraídos y adaptados de Mudarra Fraguas (2011).

Eutanasia

En el contexto de la experimentación animal, **eutanasia** (del latín *euthanasia* y griego *εὐθανασία/euthanasía*), que significa «**buena muerte**») es el término utilizado para referirse al sacrificio de un animal de laboratorio de manera rápida, minimizando o eliminando el dolor y la angustia. Se recomienda cuando, por ejemplo, un animal ya no es apto para la cría, es imposible mantenerlo en condiciones óptimas de salud y de bienestar, finaliza un experimento, es necesario la extracción de tejidos u órganos, los niveles de dolor y angustia sobrepasen el nivel previsto. En este sentido, la técnica empleada debe dar como resultado una pérdida

rápida de la conciencia seguida de un paro cardíaco o respiratorio y, finalmente, la muerte. Si la corteza cerebral no es funcional, el dolor no se experimenta (INTA, 2013).

Actualmente existen diferentes métodos de eutanasia, por lo que se deben evaluar todas las alternativas posibles y seleccionar aquella que garantice el sacrificio humanitario de los animales de experimentación. En la selección se debe tener en cuenta la especie, la edad y el estado de salud de los animales, y se debe asegurar que el método de elección sea confiable, irreversible, reproducible, fácil de realizar y seguro para el personal. Además, no debe interferir con el propósito del experimento.

Es importante NUNCA SACRIFICAR A UN ANIMAL EN PRESENCIA DE OTROS ANIMALES (a excepción de las cámaras de gas que permiten la eutanasia de varios animales al mismo tiempo). Ciertos comportamientos asociados con el dolor, miedo y angustia (p. ej.: conducta de huida, defensa o agresividad, vocalizaciones, taquicardia, jadeo, micción, defecación, aumento de la salivación, sudoración, contracciones reflejas de los músculos esqueléticos, dilatación pupilar), y la liberación de feromonas de alarma, pueden desencadenar ansiedad y temor en otros animales presentes en la misma sala (Close *et al.*, 1996; INTA, 2013).

En general, *los métodos de eutanasia se clasifican en físicos y químicos (o farmacológicos)*. Éstos se consideran "aceptables" cuando pueden usarse como el único medio de eutanasia para producir consistentemente una muerte humanitaria, y "condicionalmente aceptables o aceptables con condiciones" cuando se deben cumplir ciertos criterios para su aplicación porque: existe un mayor potencial de error del personal o riesgos de seguridad; es posible que no produzcan una muerte humana de manera constante; no están bien documentados en la literatura científica; requieren de un segundo método para asegurar la muerte (Leary *et al.*, 2020). Cualquiera sea el método utilizado, la experiencia y habilidad de la persona responsable de la eutanasia de los animales juega un papel importante en el éxito del procedimiento.

Los **métodos físicos** procuran lograr una pérdida rápida de la conciencia mediante un trauma cerebral. Pueden resultar desagradables, pero son rápidos, seguros y no contaminan químicamente los tejidos. En general, los más utilizados son: disparo con pistola de bala cautiva, concusión, aturdimiento eléctrico, dislocación cervical, decapitación. Se pueden realizar en aquellas circunstancias en que exista justificación científica, se consideren aceptables o condicionalmente aceptables para la especie de interés, un CICUAL revise y apruebe el protocolo y se garantice la disponibilidad de personal capacitado. A continuación se presenta una breve descripción de cada uno de ellos en base a la información recopilada de diversas fuentes (Canadian Council on Animal Care [CCAC], 2010; Close *et al.*, 1996, 1997; INTA, 2013; Leary *et al.*, 2020):

- **Disparo con pistola de bala cautiva:** esta herramienta se utiliza para causar daño cerebral inmediato. Es un método condicionalmente aceptable para ciertas aves, peces y reptiles de gran tamaño, y para el ganado (grandes mamíferos). Debe ser realizado por personal competente, utilizando el equipo apropiado según la especie. Luego del procedimiento, se debe aplicar un segundo método para asegurar la muerte del animal, como la exanguinación (pérdida aguda y masiva de la volemia mediante la sección de grandes vasos, como las arterias carótidas).
- **Concusión (aturdimiento por golpe o *stunning*):** se refiere a un golpe rápido en la cabeza del animal, con suficiente energía para causar la pérdida inmediata de la conciencia. La ubicación del golpe debe apuntar al área donde el cerebro está más cerca de la superficie de la cabeza y donde el cráneo es más delgado. Bajo ninguna circunstancia se debe utilizar martillo o hacha de matadero para causar traumatismo. Es un método condicionalmente aceptable para la eutanasia de peces y puede considerarse como un método de emergencia para provocar la muerte de pequeños animales (por ejemplo, cerdos recién nacidos heridos). Debe ser realizado por personal competente, utilizando el equipo apropiado. Inmediatamente después del aturdimiento se debe realizar la exanguinación del animal, o causar lesión irreversible del corazón o del cerebro.
- **Aturdimiento eléctrico (*electroshock*):** consiste en una corriente eléctrica dirigida a través del cerebro para causar la pérdida rápida de la conciencia antes de la fibrilación cardíaca o simultáneamente con la fibrilación cardíaca. Se suele utilizar en ovejas, cabras, cerdos y aves de corral, empleando un equipo especial. Luego del procedimiento, se debe aplicar un segundo método para asegurar la muerte del animal, como la exanguinación. No se debería utilizar este método en gatos debido a la alta conductividad de su pelaje. No es aceptable para peces, ya que la corriente alterna estimula la contracción de la musculatura esquelética, cardíaca y lisa, induciendo tetania, no anestesia.
- **Dislocación cervical:** produce una lesión irreversible del tallo cerebral e inconsciencia inmediata. Es un método condicionalmente aceptable para la eutanasia de pequeños roedores y conejos de < 200 g, y algunas especies de aves. Se recomienda proceder en animales previamente anestesiados (a menos que la anestesia interfiera con los resultados del estudio), debido a que puede causar dolor intenso y angustia si el procedimiento se realiza incorrectamente. La dislocación cervical manual debe ser realizada por personal capacitado y sólo cuando el número de animales a sacrificar es relativamente bajo, para evitar errores humanos debido a la fatiga.

- **Decapitación:** Este método requiere de una guillotina (o instrumento cortante) que permite realizar el procedimiento (separación total de la cabeza del cuerpo) en un solo intento, consiguiendo una rápida pérdida de la conciencia del animal. La guillotina debe limpiarse a fondo con cada uso, las cuchillas deben estar afiladas y el personal debe ser competente en el manejo adecuado de la especie y en la realización del procedimiento. Es condicionalmente aceptable para la eutanasia de roedores, conejos pequeños (< 1kg), aves y peces. Se recomienda el uso de anestesia antes de la decapitación, a menos que la misma interfiera con los resultados del estudio o la manipulación para la administración del agente genere mayor estrés en el animal. En peces, el procedimiento debe ir seguido de destrucción del cerebro o exanguinación.

No se aceptan como métodos físicos de eutanasia la descompresión, la hipotermia o la hipertermia, el ahogamiento, el estrangulamiento y la rotura del cuello, por no producir inconciencia de manera rápida y causar dolor y angustia antes de la muerte.

Por su parte, los **métodos químicos** se basan en la administración de agentes (inhalatorios o inyectables) que producen inconsciencia, fallo cardiovascular, fallo respiratorio y la muerte. Debido a la posibilidad de que se produzcan errores en la dosificación o administración y el animal pueda recuperarse, siempre hay que garantizar la muerte con otros métodos como, por ejemplo, exanguinación, dislocación cervical, o lesión irreversible del corazón. En roedores y animales pequeños, la lesión en el corazón puede realizarse con tijera, seccionando el corazón o los grandes vasos situados en la parte posterior del tórax. No se acepta el uso de agentes químicos que produzcan la muerte sin una inconsciencia previa (agentes paralizantes, cloruro potásico, etc.). Entre los métodos más utilizados destacan:

- **Monóxido de carbono (inhalatorio):** generalmente se usa en concentraciones del 4% al 6% dentro de una cámara de la más alta calidad. El monóxido de carbono se une a la hemoglobina e impide que el oxígeno sea transportado por ésta, produciendo hipoxia. Es un gas incoloro e inodoro, siendo difícil de detectar y altamente tóxico, resultando muy peligroso para el personal si lo inhala accidentalmente. Por lo tanto, antes del uso deben recibir instrucciones detalladas sobre el procedimiento y comprender los riesgos y limitaciones. Además, la cámara de monóxido de carbono debe estar en buenas condiciones para evitar fugas y la sala debe tener monitores de monóxido de carbono. Por todo lo anterior, no se usa comúnmente en entornos con animales de laboratorio.
- **Dióxido de carbono (inhalatorio):** el gas se conduce a una cámara diseñada para tal fin, que debe vaciarse y limpiarse entre usos. Es un método muy utilizado

para la eutanasia de roedores y aves, particularmente cuando es necesario sacrificar grandes grupos de animales. Tiene como desventaja que puede producir ansiedad y estrés, motivo por el cual es evaluado permanentemente. Actualmente, para roedores se recomienda colocar primero a los animales en la cámara de eutanasia y luego introducir dióxido de carbono a una velocidad de flujo del 30-70% del volumen de la cámara por minuto. Las velocidades de flujo superiores al 70% del volumen de la cámara por minuto probablemente provoquen dolor antes de la pérdida de la conciencia, mientras que las velocidades de flujo inferiores al 30% del volumen de la cámara por minuto son demasiado lentas para provocar la pérdida de la conciencia. Este método no es aceptable en roedores neonatos, por su tolerancia a la hipoxia. Hasta el día 5 postnatal se puede utilizar la congelación rápida con nitrógeno líquido. Tampoco es aceptable en reptiles, por su bajo metabolismo y su tolerancia a la hipoxia, y en especies acuáticas porque puede causar dolor por la formación de ácido carbónico en las membranas respiratorias y oculares, cuando el dióxido de carbono se disuelve en el agua.

- **Sobredosis de anestésico (inhalatorio):** los anestésicos inhalatorios más adecuados son los halogenados como el isoflurano, el halotano y el enflurano, con o sin óxido nitroso (este último no debe usarse solo). Tienen un efecto depresor sobre los sistemas cardiovascular y respiratorio, y actúan rápidamente en la mayoría de las especies. Para la inducción, se debe colocar al animal en un receptáculo cerrado o cámara que contenga algodón o gasa empapada con el anestésico, o este último puede introducirse desde un vaporizador. Los anestésicos en estado líquido no deben entrar en contacto con el animal antes de vaporizarse. Es un método condicionalmente aceptable para roedores de laboratorio, conejos y aves. Luego del procedimiento, se debe aplicar un segundo método para asegurar la muerte del animal, como la dislocación cervical o la exanguinación.
- **Barbitúricos (inyectable):** el pentobarbital sódico es el barbitúrico más utilizado para roedores de laboratorio debido a su larga vida útil y rápida acción. La dosis de eutanasia suele ser tres veces la dosis anestésica. También es aceptable en perros, gatos, conejos, cerdos, reptiles, aves, peces grandes y pequeños rumiantes. Administrados por vía IV producen la muerte en pocos segundos por depresión del SNC y de los sistemas cardiovascular y respiratorio. Igualmente pueden administrarse por vía IP cuando la vía IV no es práctica y causa angustia, pero debe regularse el pH para evitar irritación.

- **T-61 (inyectable):** es un agente de eutanasia inyectable compuesto por tres fármacos: un anestésico local (clorhidrato de tetracaína), un potente anestésico general (embutramida) y un relajante muscular periférico (ioduro de mebezonio). T-61 se suele usar en perros, gatos, caballos, roedores y aves pequeñas. Sólo se puede inyectar de modo IV y se debe sedar al animal antes de la administración. No se encuentra disponible en todos los países.
- **Agentes para animales acuáticos:** estos agentes se diluyen en el agua, e incluyen: benzocaína tamponada o clorhidrato de benzocaína, tricafina metano sulfonato (MS-222), quinaldina (2-metilquinolina), sulfato de quinaldina. Fundamentalmente producen depresión del SNC. La respuesta de los animales acuáticos a los agentes de inmersión puede variar según la especie, la concentración del agente y la calidad del agua. La quinaldina tiene poca solubilidad en agua y, por lo tanto, primero debe disolverse en acetona o alcohol y luego tamponarse con bicarbonato. Se debe aplicar un segundo método para asegurar la muerte del animal.

Hay numerosos agentes que son inaceptables por ser de acción lenta, producir dolor o angustia, o ser incómodos de manejar e incluso peligrosos para el personal:

-----de acción lenta: metoxiflurano, 2-fenoxietanol.

-----causan dolor, sufrimiento intenso: bloqueantes neuromusculares, sulfato de magnesio, tricloroetileno.

-----peligrosos: éter, cloroformo, gas cianhídrico, uretano, ciclopropano.

Independiente del método empleado siempre se debe confirmar la muerte del animal, fundamentalmente si no se ha aplicado un segundo procedimiento. Para ello, se debe prestar atención a señales como ausencia de ventilación pulmonar y latido cardíaco, dilatación pupilar, cianosis de las mucosas por falta de oxigenación y descenso de la temperatura corporal por debajo de los 25 °C.

Métodos Utilizados para la Eutanasia de Ratones y Ratas

Tras exponer las principales consideraciones sobre la eutanasia, en **Tabla 6** se destacan los métodos recomendados para ratas y ratones según la Comisión Europea (Close *et al.*, 1997), información modificada en base a documentos del Consejo Canadiense del Cuidado Animal (CCAC, 2010) y la Asociación Americana de Medicina Veterinaria (AVMA, por sus siglas en inglés) (Leary *et al.*, 2020).

Tabla 6. Métodos eutanásicos recomendados para ratones y ratas.

Agente	Facilidad de uso	Seguridad para el personal	Valoración estética	Valoración general 1-5	Observaciones
Pentobarbital sódico	+	+	++	5	Aceptable. Vía IV o IP.
Isoflurano Halotano Enflurano	++	+	++	5	Condicionamente aceptable. Asegurar la muerte mediante métodos físicos o por exanguinación.
Dislocación cervical	+	++	-	4	Condicionamente aceptable. Para animales < 200 g y se recomienda previa anestesia.
Dióxido de carbono	++	++	++	4	Condicionamente aceptable. No utilizar en neonatos.
Decapitación	+	++	-	2	Condicionamente aceptable. Únicamente si no se pueden utilizar otros métodos. Se recomienda previa anestesia. Caso contrario, se acepta con justificación científica. En neonatos se puede utilizar tijera.
Congelación rápida	++	+	+	1	Para fetos o roedores de no más de 5 días de nacidos. Utilizar nitrógeno líquido.

Nota: **Facilidad de uso:** ++ fácil de utilizar, + requiere práctica, - requiere entrenamiento de especialización. **Seguridad para el personal:** ++ sin riesgo, + riesgo bajo, - peligroso. **Valoración estética:** ++ estéticamente bueno, + aceptable para la mayoría, - inaceptable para muchos. **Valoración general:** de 1 a 5, siendo el 5 el más recomendable. Adaptado de "Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2" (p.16), por B. Close *et al.*, 1997, *Laboratory animals*, 31(1).

Bibliografía

- Álvarez Gómez de Segura, I. (s.f.). *Métodos de anestesia, analgesia y eutanasia*. Recuperado el 28 de febrero de 2023, de <https://www.unrc.edu.ar/unrc/coedi/docs/guia-anestesia-eutanasia.pdf>
- Canadian Council on Animal Care (CCAC). (2010). *CCAC guidelines on: euthanasia of animals used in science*. Canadian Council on Animal Care. ISBN: 978-0-919087-52-1
- Close, B., Banister, K., Baumans, V., Bernoth, E. M., Bromage, N., Bunyan, J., Erhardt, W., Flecknell, P., Gregory, N., Hackbarth, H., Morton, D. y Warwick, C. (1996). Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. DGXI of the European Commission. *Laboratory animals*, 30(4), 293–316. <https://doi.org/10.1258/002367796780739871>
- Close, B., Banister, K., Baumans, V., Bernoth, E. M., Bromage, N., Bunyan, J., Erhardt, W., Flecknell, P., Gregory, N., Hackbarth, H., Morton, D. y Warwick, C. (1997). Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. DGXT of the European Commission. *Laboratory animals*, 31(1), 1–32. <https://doi.org/10.1258/002367797780600297>
- Delsouc, M. B.; Wendel G.; Bach, N.; Randazzo, G.; Chaves, E. M.; Perino, J. y Peralta, C. M. (2022). *Guía General para el Cuidado y Uso de Animales- PARTE 1*. FQByF-UNSL. San Luis, Argentina: Material Didáctico para Estudiantes.
- Foley, P. L., Kendall, L. V. y Turner, P. V. (2019). Clinical Management of Pain in Rodents. *Comparative medicine*, 69(6), 468–489. <https://doi.org/10.30802/AALAS-CM-19-000048>
- Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC). (12 de septiembre de 2020). *Analgesia (guideline)*. University of Iowa. <https://animal.research.uiowa.edu/iacuc-guidelines-analgesia>
- Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) - CICUAL. (s.f.). *Guías de procedimientos con animales de laboratorio. Procedimientos Operativos Estandarizados- POE Vías de inoculación*. Recuperado el 28 de febrero de 2023, de <https://www.ibyme.org.ar/institucion/7/cicual>
- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). (2013). *Guía para cuidado y uso de animales de experimentación*. https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-gua_cuidado_y_uso_de_animales.pdf
- Jensen, T. L., Kiersgaard, M. K., Sørensen, D. B. y Mikkelsen, L. F. (2013). Fasting of mice: a review. *Laboratory animals*, 47(4), 225–240. <https://doi.org/10.1177/0023677213501659>

- Kohn, D. F., Martin, T. E., Foley, P. L., Morris, T. H., Swindle, M. M., Vogler, G. A. y Wixson, S. K. (2007). Public statement: guidelines for the assessment and management of pain in rodents and rabbits. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*, 46(2), 97–108.
- Krinke, G. J. (2000). *The laboratory rat*. Elsevier.
- Leary, S., Underwood, W., Anthony, R., Cartner, S., Grandin, T., Greenacre, C., Gwaltney-Brant, S., McCrackin, M. A., Meyer, R., Miller, D., Shearer, J., Turner, T. y Yanong, R. (2020). *AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2020 edition*. American Veterinary Medical Association. <https://www.avma.org/sites/default/files/2020-02/Guidelines-on-Euthanasia-2020.pdf>
- Machholz, E., Mulder, G., Ruiz, C., Corning, B. F. y Pritchett-Corning, K. R. (2012). Manual restraint and common compound administration routes in mice and rats. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (67), e2771
- Morton, D., Jennings, M., Buckwell, A., Ewbank, R., Godfrey, C. y Holgate, B. (2001). Refinando los procedimientos para la administración de sustancias. *Laboratory animals*, 35(1), 1-41.
- Mudarra Fraguas, I. (29 de noviembre de 2011). *Guía Anestesia y Analgesia en Ratas*. Universidad de Miguel Hernández de Elche. <https://sea.umh.es/files/2011/12/2222-pnt-guia-anestesia-y-analgesia-en-ratas.pdf>
- Research Animal Training. (5 de mayo de 2021). *Intramuscular Injection in the Rat*. FLAIRE Consultants. <https://researchanimaltraining.com/articles/intramuscular-injection-in-the-rat/>
- Turner, P. V., Brabb, T., Pekow, C. y Vasbinder, M. A. (2011). Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*, 50(5), 600–613.
- Vogler, G. A. (2006). Anesthesia and analgesia. En: *The laboratory rat* (pp. 627-664). Academic Press.