

Laboratory

Animals

Refinando los procedimientos para la administración de sustancias

Edición en Español de:
Laboratory Animals (2001) 35, 1-41

Editado por:



Publicación patrocinada por:



Traducción del siguiente artículo original publicado en Laboratory Animals:

Refining procedures for the administration of substances D. B. Morton; M. Jennings; A. Buckwell;
R. Ewbank; C. Godfrey; B. Holgate; I. Inglis; R. James; C. Page; I. Sharman; R. Verschoyle; L. Westall; A. B. Wilson

Laboratory Animals (2001) 35, 1-41

Este artículo ha sido revisado por:

Dr. Alberto Giráldez Dávila. Real Academia Española de Farmacia. Madrid. España.

Traducción: Manuel Moreno Calle. Centro de Investigaciones Biológicas. CSIC. Madrid. España.

Coordinador: José M^a Orellana Muriana. Universidad de Alcalá. Madrid. España.

Con el agradecimiento al Council of Management de Laboratory Animals Limited por su ayuda y colaboración en la realización de este trabajo.

Imprenta: Gráficas Algorán

Dep. Legal: M-XXXXX-2002

Laboratory Animals

Revista Internacional sobre la
Ciencia y el Bienestar del Animal de Laboratorio

REVISTA OFICIAL DE

LASA Laboratory Animal Science Associatio

GV-SOLAS Gesellschaft für Versuchstierkunde

ILAF Israeli Laboratory Animal Forum

NVP Nederlandse Vereniging voor Proefdierkunde

SGV Schweizerische Gesellschaft für Versuchstierkunde

SECAL Sociedad Española para las Ciencias del Animal de
Laboratorio

FELASA Federation of European Laboratory Animal Science
Associations

Contenidos

Octubre 2002

Refinando los procedimientos para la administración de
sustancias

Informe del Grupo de Trabajo sobre Refinamiento formado por
BVA/AVF/ FRAME/RSPCA/UFAP.

Miembros del Grupo de Trabajo sobre Refinamiento: D.B. Morton
(Presidente), M. Jennings (Secretaria), A. Buckwell, R. Ewbank, C.
Godfrey, B. Holgate, I. Inglis, R. James, C. Page, I. Sharman, R.
Verschoyle, L. Westall & A. B. Wilson.

Refinando los procedimientos para la administración de sustancias

Informe del Grupo de Trabajo sobre Refinamiento formado por BVAWF/ FRAME/RSPCA/UFAW.

Miembros del Grupo de Trabajo sobre Refinamiento: D.B. Morton (Presidente)¹, M. Jennings (Secretaria), A. Buckwell, R. Ewbank, C. Godfrey, B. Holgate, I. Inglis, R. James, C. Page, I. Sharman, R. Verschoyle, L. Westall & A. B. Wilson.

Contenidos

Prólogo	4	3.8 Intravaginal	22
1 Introducción y objetivo de este trabajo.	4	3.9 Intravenosa e intra-arterial	23
2 Principios generales de "buenas prácticas".	5	3.10 Vías orales	26
2.1 Planificación y preparación	5	3.10.1 Inclusión en la comida o bebida del animal	27
2.1.1 Objetivo experimental	5	3.10.2 Administración directa en la faringe	28
2.1.2 La vía	5	3.10.3 Sonda oral	29
2.1.3 La sustancia	5	3.11 Minibombas osmóticas	31
2.1.4 El animal	7	3.12 Vías respiratorias	32
2.1.5 La técnica	7	3.12.1 Exposición de toda la superficie corporal	32
2.1.6 Personal y formación	9	3.12.2 Sólo exposición nasal/ del hocico	33
2.2 Preparación técnica y cuidados posteriores	10	3.12.3 Exposición mediante máscara	34
2.3 Refinamiento general para todas las vías de administración	11	3.13 Subcutánea	35
3 Refinamiento para cada una de las vías y procedimientos.	15	3.14 Tópica-dérmica	36
3.1 Intra-articular	15	3.15 Tópica-ocular	37
3.2 Intracerebral (intracerebroventricular)	16	3.16 Almohadilla plantar	38
3.3 Intradérmica	17	3.17 Vías inusuales	39
3.4 Intramuscular	18	4 Consideraciones especiales para animales salvajes	39
3.5 Intranasal	19	Referencias	40
3.6 Intraperitoneal	20		
3.7 Intratraqueal	21		

La correspondencia y petición de separatas del artículo original en inglés deben dirigirse a: Professor D. B. Morton, Department of Biomedical Sciences & Biomedical Ethics, The Medical School, University of Birmingham, Edgbaston, Birmingham B15 2TT, UK.

Las separatas de la versión en español pueden conseguirse gratuitamente a través de la página web de la SECAL: <http://www.secal.es>

Prólogo

Este es el quinto informe, dentro de la serie producida por el Grupo de Trabajo sobre Refinamiento organizado por la British Veterinary Association Animal Welfare Foundation/Fundación para el Bienestar Animal de la Asociación Británica de Veterinarios (BVAAWF), el Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments/Fondo para el Reemplazamiento de los Animales en los Experimentos Médicos (FRAME), la Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals/Real Sociedad para la Prevención de la Crueldad a los Animales (RSPCA) y la Universities Federation for Animal Welfare/Federación de Universidades para el Bienestar Animal (UFAW). Estos informes se basan en el principio fundamental de que, si hay que utilizar animales en los laboratorios, debemos plantearnos que un objetivo tan importante como lograr resultados experimentales, debe ser el de conseguir minimizar cualquier dolor y malestar. Esto es esencial por razones humanitarias, a la vez que es necesario para cumplir con el conjunto de principios legales de las legislaciones nacionales e internacionales, así como para conseguir resultados científicos fiables y reproducibles.

Los miembros de cada Grupo de Trabajo proceden de la comunidad científica, de la industria y de organizaciones académicas y de bienestar animal. Algunas de las organizaciones participantes (por ejemplo, la Real Sociedad para la Prevención de la Crueldad a los Animales) se oponen al uso de animales en experimentos que puedan causarles dolor, sufrimiento, malestar o lesiones duraderas, por lo que este taller resultó particularmente difícil para quienes estaban en esa posición dada la naturaleza de los procedimientos discutidos. (Nota: la participación en este Taller no significa que la Sociedad acepte que la investigación necesite el uso de los procedimientos descritos.) Sin embargo, el objetivo común es reducir el sufrimiento animal dondequiera que ocurra y el informe pretende ayudar a conseguirlo, especialmente si se lee conjuntamente con otras publicaciones recientes sobre el reconocimiento, medida y reducción del dolor o malestar en los animales.

Este Taller también tuvo muchas dificultades para elaborar el informe, debido en parte a la amplitud de la materia y al número de procedimientos que nos propusimos cubrir. Además, aunque muchas de las técnicas están brevemente descritas, el tipo de información

detallada requerida acerca de los potenciales problemas, soluciones y otros modos de refinar las técnicas, no había sido cotejada previamente y no estaba disponible en la literatura.

Se espera que el informe tenga una amplia difusión en los foros internacionales y que las recomendaciones sean adoptadas como una buena práctica habitual.

1. Introducción y objetivo de este trabajo

Los procedimientos que utilicemos en la administración de sustancias a animales pueden tener un efecto significativo sobre el bienestar de los mismos y el valor científico de los resultados. Si se llevan a cabo incorrectamente, ambos pueden verse comprometidos. Al refinar los procedimientos de administración, por lo tanto, se proporcionan oportunidades para mejorar a la vez el bienestar y la ciencia. Los beneficios del bienestar son ampliamente reconocidos; los beneficios científicos se derivan de una mayor precisión de los datos obtenidos cuando los experimentos se preparan más cuidadosamente, usando animales menos estresados, es decir, más “normales” (Manser 1992, Vogel 1993, Poole 1997).

La administración de sustancias es un tema muy amplio: se administran muchos tipos de sustancias, con muchos tipos de técnicas, rutas diferentes y con distintos propósitos. Los métodos utilizados están descritos en un buen número de publicaciones (p.e. Paget & Thomson 1979, Kirk & Bistner 1985, Poole 1987, Rollin & Kessel 1990, Waynforth & Flecknell 1992, Tuffery 1995, Wolfensohn & Lloyd 1998). La Asociación para las Ciencias del Animal de Laboratorio (LASA, 1998) ha elaborado recientemente unas directrices sobre buenas prácticas. Este trabajo pretende complementar la literatura existente mediante la identificación de problemas potenciales con métodos y procedimientos específicos, centrándose en el modo en que éstos pueden ser refinados para reducir efectos adversos y desarrollar una práctica mejor. Se presta atención a las vías más frecuentemente utilizadas en las especies de animales de laboratorio más habituales y se incluyen notas sobre métodos adicionales o sobre otras especies, cuando es conveniente. Se ha puesto mayor énfasis en las técnicas realizadas en investigación biomédica y ensayos, aunque algunos de los principios también tienen aplicaciones clínicas en veterinaria.

El trabajo debe proporcionar información útil para cualquiera que planifique o realice los

procedimientos o para quien tenga que tratar con sus consecuencias. Los principios generales de “buenas prácticas” cuando se administra una sustancia por cualquier ruta, se establecen en la Sección 2, junto con recomendaciones para el refinamiento con respecto a la sustancia administrada, el equipo y las técnicas a emplear. El trabajo concluye con una sección (Sección 3) con especial consideración a la administración de sustancias a los animales salvajes.

El trabajo está basado en la bibliografía publicada si está disponible y en la opinión de los expertos del grupo de trabajo y de sus colegas.

2. Principios generales de buenas prácticas

Cuando se administra una sustancia a un animal por cualquier vía, el objeto debe ser conseguir la mejor práctica, puesto que los errores en cualquier estadio pueden provocar un sufrimiento evitable y/o un gasto de animales vivos. La mejor práctica se basa en minimizar o evitar efectos adversos, disminuir cuanto se pueda el número de animales utilizados y maximizar la calidad y aplicabilidad de los resultados.

2.1 Planificación y preparación

La probabilidad de que surjan dificultades se reduce con una buena preparación, por lo que debe tenerse previsto un plan de contingencias por si ocurrieran problemas. En la Tabla 1 se da una lista de preguntas que debemos hacernos para planificar correctamente los procedimientos.

2.1.1 Objetivo experimental

Los objetivos científicos deben alcanzarse por la vía y el régimen de administración seleccionado, por lo tanto es importante plantearse esto en primer lugar. Debe considerarse qué tipo de resultados van a obtenerse, junto con el modo en que se relacionan con el propósito del estudio y qué se hará con los resultados y con los animales.

En esta fase es importante considerar no solamente si el experimento puede hacerse, sino también si debe ser realizado, dados los probables efectos sobre el animal.

4.1.2 La vía

La elección de la vía viene determinada por el propósito del experimento, las especies animales, los posibles efectos de la técnica de administración sobre el animal y la frecuencia de dosificación esperada. Tanto la elección de la técnica y si es

relevante, el lugar elegido, estarán influenciados por aquellos factores.

Hay algunas técnicas y vías que son más interesantes que otras, por ello debe elegirse la que menos interaccione con el propósito del experimento (ver tabla 2).

2.1.3 La sustancia

Hay algunas restricciones sobre las formulaciones que pueden ser utilizadas en alguna determinada vía. Tanto la sustancia como el medio en que se vehicula deben ser apropiados para la vía elegida, las especies y el propósito del experimento. En la bibliografía existente puede encontrarse información detallada sobre los factores a considerar (ver por ejemplo, Sanderson 1959, Spiegel & Noseworthy 1963, The Merck Index 1968, Claasen 1994, Waynforth 1995, Reynolds 1996). El siguiente resumen pretende ser únicamente un punto de partida.

Propiedades físico-químicas: Las propiedades físico-químicas de la sustancia y/o su vehículo pueden afectar adversamente a los animales. Estas incluyen: la formulación, solubilidad, viscosidad, pH, biocompatibilidad, pureza, estabilidad, estandarización y contaminación microbiana. Siempre deben consultarse los datos existentes sobre las propiedades de la sustancia así como los efectos indeseables (p.e. irritación). Los efectos esperados pueden ser modificados por la concentración y el volumen de la dosis, situación que también habría que considerar. Una referencia útil es el *Dictionary of Substances and their Effects* (Richardson 1993, Claasen 1994).

Soluciones y disolventes: Cuando las sustancias son administradas en forma de soluciones, los disolventes más utilizados y más simples son el agua para inyección y el suero fisiológico. Para compuestos insolubles en agua se puede emplear un disolvente orgánico adecuado. Idealmente, éste debe carecer de efectos farmacológicos, ser estable en las condiciones de uso, no tóxico, no irritante y no sensibilizante. La viscosidad debe ser la adecuada para facilitar la inyección. El solvente debe permanecer fluido a la temperatura a la que será usado y lo deseable es que tenga un punto de ebullición suficientemente alto para permitir su esterilización por calor si fuera necesario. Desafortunadamente, no existe el disolvente ideal; muchos son adecuados sólo para determinadas vías por lo que habrá que evaluar los existentes para decidir cuál es el más apropiado.

Tabla 1. Lista de preguntas a contestar cuando se planifican los procedimientos

Objetivo experimental	<p>¿Qué se está intentando conseguir científicamente? Con el régimen de administración elegido ¿se conseguirán los objetivos del experimento? Considere no sólo si puede hacerse, sino también si debe hacerse y si hay un modo mejor de hacerlo.</p>
La vía	<p>¿Es la vía de administración adecuada para la sustancia? ¿Tiene la vía propuesta una alta tasa de severidad/gravedad? ¿Se conseguirían los mismos objetivos con una vía menos severa? ¿Es la vía adecuada para administraciones repetidas?</p>
La sustancia	<p>¿Está seguro de que sabe lo que está administrando? ¿Tendrá la sustancia algún efecto adverso sobre el animal y existen datos sobre ello? Si los hay, ¿se han tomado las precauciones necesarias? ¿Puede la composición de la formulación alterar los efectos esperados? ¿Hay que preparar la sustancia en el momento? La concentración y el volumen de la dosis ¿alterarán los efectos esperados? ¿Hay que considerar alguna otra cosa teniendo en cuenta las propiedades físico-químicas de la sustancia o los solventes asociados, p.e. la osmolaridad? ¿Se puede reducir el volumen? ¿Se puede reducir la frecuencia de administración? Si la sustancia es tóxica, ¿se puede reducir la dosis? ¿Es probable que la sustancia sea irritante? ¿Es necesario realizar estudios preliminares, p.e., para averiguar la dosis tolerada y/o efectiva?</p>
El animal	<p>¿Hay problemas con alguno de los animales, la especie o la cepa? ¿Se estresa el animal fácilmente con el manejo? ¿Es el más adecuado para el estudio en estas condiciones? ¿Se le puede adiestrar para que coopere con el procedimiento? ¿Necesita tiempo para aclimatarse al procedimiento? ¿Es necesario administrarle un anestésico, sedante o analgésico? ¿Se reduciría así el estrés o alteraría el experimento? ¿Ha hecho un estudio preliminar para averiguar los niveles de dosis efectiva y tolerada en la cepa utilizada?</p>
La técnica	<p>¿Cuáles son los problemas científicos (p.e. metabolismo de primer paso en el hígado tras la administración oral o intraperitoneal, grado o tasa de absorción, efectos locales)? ¿Cuáles son los problemas técnicos? (P.e. ¿cuál es la manera correcta de sujetar un animal para permitir la inserción de la cánula con las menores molestias?) ¿Tendrá la técnica en sí algún efecto sobre el animal? ¿Están claramente definidos los límites de severidad/gravedad y el momento de punto final (end-point)? ¿Qué refinamientos pueden introducirse para contrarrestar cualquier efecto adverso? ¿Es necesario un estudio preliminar? ¿Ha consultado las referencias y experiencias de otras organizaciones?</p>
Personal	<p>¿Posee el personal la autorización pertinente? ¿Es el personal competente en la técnica y está entrenado para tratar con cualquier efecto desfavorable? ¿Quiénes son los mejores miembros de la plantilla para realizar el procedimiento, considerando tanto el manejo de los animales como el procedimiento en sí? ¿Hay suficiente personal disponible para sujetar y administrar a los animales y para controlarlos tras la administración? ¿Conocen los límites de severidad/gravedad? ¿Se les ha delegado la autoridad y tienen suficiente destreza para sacrificar animales si se sobrepasan los límites de severidad/gravedad?</p>

Los sólidos insolubles o los productos químicos inmiscibles pueden ser dosificados como suspensiones o emulsiones en agentes tales como goma de tragacanto o metil-celulosa, Lissapol®, Sorpol® o Tween®. Recuerde que productos como Tween® y Cremophor® pueden provocar reacciones de tipo anafiláctico cuando se administran intravenosamente en perros.

Las formulaciones deben usarse tan pronto como sea posible después de su preparación, o dentro del período considerado satisfactorio para el mantenimiento de estabilidad y calidad de la formulación.

Tasa de absorción. La farmacología o toxicidad esperada de una sustancia puede ser influida por su tasa de absorción, la cual está a su vez influida por: (a) sus propiedades físicas tales como: conformación molecular, carga, tamaño de partícula, estructura cristalina, solubilidad lipídica, forma salina, tasa de desintegración (cuando la forma farmacéutica es sólida) grado en que el producto químico es ionizado en la membrana de absorción; (b) la vía de administración (para más detalles ver Waynforth 1995). Los estudios piloto farmacocinéticos / metabólicos pueden ser valiosos (o esenciales) antes de las administraciones a largo

plazo para confirmar que la dosis alcanza los órganos diana.

Factores externos. Los factores externos también pueden tener efecto sobre la farmacología o toxicidad de una sustancia. Éstos incluyen: variaciones en la temperatura ambiental, el número y/o la densidad de los animales estabulados juntos, su estado nutricional y el momento de aplicar las dosis respecto al ritmo circadiano, normalmente controlado por el ciclo de luz/oscuridad (Friedman & Walker 1972, Weithe 1973, Rao 1986, Wollnik 1989, Waynforth 1995).

2.1.4 El animal

Especies y cepas: A la hora de seleccionar la especie y cepa del animal, habrá que considerar los factores de bienestar tanto como la necesidad de conseguir los objetivos científicos. Los principales puntos a considerar son: Si existen contraindicaciones sobre el uso de alguna especie o estirpe animal en particular, si el animal es el apropiado para la vía y compuesto a dosificar, si se le puede proporcionar un alojamiento adecuado y si el animal es fácil de manejar. Algunas estirpes de animales de laboratorio son más dóciles y fácilmente manejables por lo que puede ser beneficioso seleccionar éstas para reducir el estrés.

Sexo: Algunos estudios pueden requerir solamente machos o hembras, con lo que se produce un desaprovechamiento significativo de animales del sexo no deseado. Debe cuestionarse siempre la justificación científica, económica o tradicional, para usar un sólo sexo, con el fin de reducir esta pérdida. La motivación inicial puede haber sido las implicaciones para el bienestar animal, por ejemplo, la mayor facilidad para agrupar hembras de animales como el ratón. Sin embargo, quizás fuera posible adaptar los sistemas de estabulación de manera que los machos también puedan ser alojados en grupos (Jennings *et al.* 1998).

Habituação y adiestramiento: Muchos animales, antes de llegar al centro de investigación, pueden haber tenido poca o ninguna experiencia acerca de ser manejados o inmovilizados, de modo que es probable, que en la primera ocasión en que se les coja, se encuentren inquietos y asustados. Esto no solamente convierte el procedimiento en más estresante para el animal y más difícil para el operario, sino que también es probable que los resultados se vean alterados por variaciones existentes relacionadas con el estrés. El primer

paso, por lo tanto, debe ser conseguir animales acostumbrados al manejo en su entorno. Muchas especies se familiarizan con alguna persona en particular, por eso es bueno que el personal que efectúe la administración desarrolle esta relación de antemano. La importancia de este hecho está reconocida en perros y primates pero en otras especies como ratas y ratones también es beneficiosa. Cuando se manejen los animales se les puede acostumbrar a las posturas en las que se les sujetará cuando se vaya a aplicar las dosis, de manera que se reduzca el estrés cuando se apliquen éstas.

Cuando las sustancias se administran con poca frecuencia pero en un régimen a largo plazo (p.e. toxicología de dietas en roedores) el manejo de los animales durante la rutina diaria de trabajo ayuda a reducir el estrés cuando se les aplican las dosis. En general, se debe animar al personal a manejar los animales tanto como sea posible. Hay excepciones a esta regla, p.e. con los neonatos, o si es probable que el manejo modifique los efectos de los procedimientos.

Algunas especies de animales pueden ser entrenadas para cooperar con el manipulador durante el manejo y la dosificación, de este modo puede reducirse mucho más el estrés. El entrenamiento con recompensa (refuerzo positivo) puede estimular al animal a participar en el procedimiento de administración, p.e. los primates presentarán el brazo (Reinhardt 1991, 1997).

En raras ocasiones, por ejemplo en administraciones únicas cuando no hay tiempo para habituar al animal al manejo o al procedimiento, puede ser más conveniente sedarlo antes de darle la dosis. Sin embargo, puesto que esto en sí mismo ya requiere proceder a sujetar y dosificar, habrá que sopesar cuidadosamente las ventajas y desventajas de la sedación.

2.1.5 La técnica

Es necesario prever si con algunas técnicas concretas, pueden surgir dificultades prácticas que puedan comprometer los objetivos científicos o el bienestar de los animales, con el fin de evitarlas. Por ejemplo, puede haber un límite en cuanto al volumen máximo de la dosis o el grado de absorción de la sustancia, o bien un procedimiento (tal como la sonda oral) puede exigir una considerable habilidad técnica.

Es importante estudiar una técnica antes de llevarla a cabo y obtener información bibliográfica y/o de otros expertos sobre ella. Algunos factores concretos a considerar son: si la técnica y no la

Tabla 2. Impacto de la vía de administración sobre el bienestar del animal

Vía	Nº de dosis	Inmovilización	Comentario	Impacto sobre bienestar
Intra-articular	S	Anestesia	Puede dañar la articulación. Es esencial llevarla a cabo en condiciones estériles. Utilizar sólo una vez.	•••
Intracerebral	S	Anestesia	Técnicamente difícil en neonatos. Puede producirles la muerte si no se realiza correctamente, si el volumen o composición del material no son los adecuados o por abandono de la madre a las crías.	•••
Intradérmica	R	M	Es esencial realizarlo bien para asegurar que la inyección no sea subcutánea.	••
Intramuscular	R	M	Los efectos irritantes pueden ser un grave problema. Posible lesión en los nervios. Hay que evitar inyectar en la fascia o en los vasos sanguíneos. Las lesiones tisulares producidas por los efectos de un volumen excesivo de dosis permanecen ocultas. Precaución con los adyuvantes. Inyectar las siguientes administraciones en lugares diferentes.	••
Intranasal	R	M	No es fácil garantizar que toda la dosis haya entrado en las fosas nasales. Los efectos adversos son improbables, pero hay que tener cuidado con los fluidos.	•
Intraperitoneal	R	M	Las sustancias irritantes producen problemas graves. Es fácil la inoculación de un órgano sin darse cuenta de que esto se haya producido. No recomendada en especies de mayor tamaño que los roedores.	••
Intraqueal	S	Anestesia	Puede producir la muerte si la sustancia se administra equivocadamente o si es irritante.	•••
Intravaginal	R	M	Puede resultar difícil retener la sustancia en la vagina.	•
Intravenosa, no roedores	R	M	Los efectos tromboembólicos sobre el S.N.C. (y probablemente sobre el corazón) son relativamente habituales.	••
Intravenosa, roedores	R	M	Si fuera necesario calentar las venas para dilatarlas, debe hacerse con cuidado. Si se inyecta rápidamente puede que algún trombo alcance el S.N.C. u otro órgano ocasionando la muerte.	••
Intravenosa	R	Atado, chaqueta, arnés	Es fundamental mantener la asepsia durante la técnica. Puede requerir cirugía. Es un campo en expansión, en el que se están desarrollando nuevas técnicas de infusión.	•••
Oral:				
En dieta/agua	R	Ninguna	La dosis puede variar dependiendo de la ingesta de alimento/agua. La administración con la alimentación produce muy poco estrés pero la baja palatabilidad (mal sabor) puede reducir la ingesta. Posible angustia por sed. Es importante tener un buen conocimiento de las pautas nutricionales.	•
Cápsulas	R	M	Fácil de administrar en perros y primates siendo los fallos muy poco frecuentes. Se pueden utilizar para facilitar la administración de pastillas.	•
Sonda	R	M	Es esencial la correcta colocación de la sonda. Aún siendo los errores poco frecuentes, una mala colocación de la sonda puede provocar la muerte en roedores. La sujeción puede ser estresante para primates.	••

Bombas osmóticas	Continua	Anestesia, después nada	Permite evitar la repetición de inyecciones.	••
Respiratoria:				
Exposición corporal total	R	Ninguna	Aunque es difícil medir la dosis, los fallos o problemas técnicos o de bienestar son escasos.	•
Sólo nasal (roedores)	R	Tubos (Cepos)	El cepto es estresante. Es esencial adiestrar y habituar a los animales.	•
Máscara de inhalación (perros o primates)	R	Hamaca o silla	Inmovilización estresante. Es fundamental adiestrar y habituar a los animales.	••
Subcutánea	R	M	Cambiar de lugar en dosis sucesivas. Precaución con los adyuvantes.	•
Tópica-dérmica	R	Vendas, collar, envuelto	La retirada de los vendajes adhesivos puede ser dolorosa. Hay que adiestrar a los animales para que acepten el collar u otros sistemas de inmovilización. Las sustancias irritantes son problemáticas.	••
Tópica-ocular	R	M	La técnica es fácil, pero se puede producir una lesión ocular por sustancias irritantes siendo muy dolorosa.	•

M = Inmovilización manual durante la administración. R= dosis repetidas. S= dosis única.

• Mínimo impacto: es decir, no doloroso, no doloroso, inmovilización mínima, rápido o no invasivo.

•• Máximo impacto: es decir, se requiere anestesia (con el riesgo concomitante) no se excluye la muerte o un daño serio si la técnica no se ejecuta correctamente.

Nota: El sistema de valoración hace referencia al impacto de la vía pero no al de la sustancia, presuponiendo que la técnica la realiza personal entrenado y competente y con los medios adecuados. La valoración está también basada en la experiencia del procedimiento sobre los humanos. El grado de severidad de una técnica concreta puede variar dependiendo de la especie tratada.

sustancia, es la que tiene algún efecto sobre el animal; si el equipo a utilizar es el más apropiado; si la frecuencia de administración puede ser reducida; y si los momentos de punto final (*end-points*) están claramente definidos y son humanitarios.

En este punto, debe considerarse si hay algún modo de refinar aún más las técnicas o procedimientos.

2.1.6 Personal y formación

El mejor modo de asegurar el menor malestar para los animales durante los procedimientos es llevarlos a cabo de modo adecuado y eficiente. La severidad de incluso un procedimiento simple, se ve incrementada si se ejecuta torpemente. **Es responsabilidad de todos los estabularios y equipos de investigación asegurar que los animales son solamente cogidos, inmovilizados, dosificados y explorados por personal competente bien formado. Debe disponerse para cada una de estas fases, del suficiente personal competente.**

La selección del personal para realizar los procedimientos debe tener en cuenta su habilidad en el manejo de los animales, así como en la ejecución de las técnicas específicas. La formación del personal y la adecuada supervisión de las fases del aprendizaje son muy importantes. Los componentes esenciales incluyen:

Manejo del animal: Es importante el entrenamiento en el manejo de las especies que van a ser tratadas, puesto que un manejo e inmovilización realizados con sensibilidad y de manera adecuada minimizan el malestar del animal. Esto también ayuda a asegurar la confianza y destreza en la ejecución de los procedimientos de trabajo, lo que reduce en la reducción del estrés del animal.

Utilización de recursos para el aprendizaje: Los vídeos y programas de ordenador educacionales son recursos útiles (ver Zinko *et al.* 1997), preferiblemente si son vistos o comentados con detalle por una persona experimentada. Los animales muertos recientemente (o conservados) y las maquetas de animales, tales como la rata y conejo Koken®, pueden usarse para el estudio de la anatomía y la práctica de las técnicas. Particularmente útiles son los modelos desarrollados por Moredun Isolators Ltd (Pentland Science Park, Bush Loan, Penicuik, Scotland EH26 OPZ).

Prácticas con objetos inanimados: Objetos como las frutas pueden ser utilizados para familiarizarse con el manejo y uso de agujas, jeringas y otros equipos, p.e. las mandarinas pueden utilizarse para practicar inyecciones subcutáneas.

Observación y asistencia: El aprendiz debe observar y tomar parte tanto como le sea posible, en las técnicas relacionadas con un procedimiento antes de llevarlo a cabo. Esta es una parte esencial del aprendizaje, por lo que no puede ignorarse su importancia. También puede ser útil y necesaria la visita a establecimientos con experiencia en una técnica concreta.

Supervisión: Una vez autorizado para realizar un procedimiento, el aprendiz debe inicialmente dar apoyo y después realizarlo personalmente bajo la supervisión directa de un miembro experimentado del personal, hasta que haya conseguido suficiente experiencia para practicarlo sin errores. Los supervisores deben explicar ampliamente lo que están haciendo y señalar cómo y dónde pueden ir mal las cosas para ayudar al aprendiz a evitar los problemas. Además deben animarle a que haga preguntas. Incluso cuando el aprendiz se haya familiarizado con la técnica, el supervisor si es necesario debe siempre estar disponible para ayudar y responder preguntas. (En Gran Bretaña se requiere la supervisión bajo el sistema de licencia personal y debe ser tratado con el Inspector local del Ministerio del Interior).

Manteniendo la competencia: Todo el personal debe mantener su propio nivel de competencia o asignar el trabajo a una persona que sea competente y use la técnica con regularidad. Esto es aplicable, en especial, para quienes solamente ejecutan un procedimiento de forma ocasional o en un pequeño número de animales. Puede asegurarse un mayor nivel de calidad si los procedimientos son realizados siempre por personal del centro, más que si son realizados por científicos menos diestros en tales técnicas. Cuando no exista esta opción sería conveniente contar con un programa de re-entrenamiento, donde los vídeos y modelos son particularmente útiles. En este caso puede ser necesaria una supervisión adicional.

En Gran Bretaña es necesaria la asistencia a un curso de formación acreditado, junto con la supervisión, hasta que se adquiere la competencia suficiente, además se necesita de un entrenamiento adicional para técnicas quirúrgicas

u otras especialidades. No se puede practicar con animales vivos de especies protegidas por la ley británica.

Concienciación: El personal debe tener un conocimiento detallado de qué se está haciendo a los animales a su cargo y cuándo se está haciendo. Debe conocer el momento de punto final (*end-point*) y los límites de severidad del proyecto para reconocer si éstos son sobrepasados. Debe también tener autoridad delegada y la destreza suficiente para sacrificar los animales, si fuera necesario. Se debe poner al alcance de todo el personal que lo necesite, la información sobre a quién acudir para buscar consejo (expertos en animales de laboratorio, tecnólogos de animales, el veterinario adscrito al establecimiento, etc.).

2.2 Preparación técnica y cuidados posteriores

Antes de comenzar la administración: Si existe riesgo de que se produzcan efectos adversos, debe considerarse la realización de un estudio piloto con un pequeño número de animales, antes de que la sustancia les sea administrada por primera vez. Siempre:

- Hay que estar seguro de que se está haciendo lo que se debe realizar, p.e. comprobar que tanto la sustancia como el vehículo son estables y puros; comprobar las etiquetas de las sustancias y de las cubetas o animales para asegurar que se da la sustancia correcta al animal correcto y en la dosis correcta.
- Asegurarse de que el equipamiento necesario está a mano, limpio o estéril si fuera necesario y que funciona adecuadamente.
- Verificar la duración prevista y el protocolo experimental para determinar el número de animales en cada grupo de dosis y la duración de cualquier investigación adicional relacionada con la administración (p.e. recogida de muestras de orina o sangre) y tener preparados los recipientes necesarios, previamente etiquetados.
- Comprobar el sexo, edad, peso y condición de cada animal.

Los animales deben ser siempre abordados y manejados firme, tranquila y cariñosamente y tranquilizados durante el procedimiento. Deben inmovilizarse lo menos posible.

Hay que considerar si se requiere algún anestésico, sedante o analgésico o se pueden realizar a la vez otros procedimientos (p.e. pesaje o

palpación). En general los animales deben ser pesados antes de la administración de modo que se pueda calcular la dosis correcta para su peso, pero si al manejarlos dos veces es probable que se estresen, deben ser pesados y dosificados al mismo tiempo.

Después de efectuar la administración: Los animales deben controlarse meticulosamente después de la administración. El personal debe estar siempre preparado para tratar tanto con efectos esperados como inesperados. Debe estar preparado adecuadamente para cubrir la posibilidad de que los animales sufran dolor durante la noche o el fin de semana. Si los animales mueren como resultado del procedimiento, se debe realizar una necropsia para averiguar la causa de la muerte y para evitar situaciones recurrentes.

Repetición de la administración: La repetición de las dosis debe llevarse a cabo aproximadamente a la misma hora cada día para evitar la variabilidad asociada a los ritmos circadianos.

2.3 Refinamiento general para todas las vías de administración

En la mayoría de los procedimientos hay oportunidades para el refinamiento (p.e. con respecto a la sustancia a administrar, el equipo y la técnica). Éstas pueden tener efecto significativo sobre el bienestar de los animales y la calidad de los datos científicos y se indican a continuación:

La sustancia

- (i) *Irritante/pH:* La sustancia puede causar irritación y/o ulceración de la piel, membranas mucosas o músculos, o bien destruir localmente tejidos (p.e. los endotelios de los vasos sanguíneos). Esto puede no ser fácilmente visible dependiendo de la vía de administración, pero puede causar serios problemas de bienestar. La irritación puede ser un problema importante para las vías intraperitoneal, ocular, inhalatoria e intratraqueal.
 - Compruebe siempre los datos existentes sobre la sustancia y sus efectos. Los datos terapéuticos pueden ayudar a valorar el efecto local de una sustancia, previo a su administración.
 - Las soluciones para inyección deben estar, idealmente, lo más cerca posible al pH
- neutro, ya que los extremos, alto o bajo, no son tolerados por los tejidos. Waynforth y Flecknell (1992) recomiendan un rango de trabajo entre pH 4,5-8,0. El orden en el grado de tolerancia de pH para diferentes vías de administración es: oral > intravenosa > intramuscular > subcutánea. Considere que el pH por sí solo no es un indicador suficiente del potencial irritante, ya que la irritabilidad también depende de la concentración y punto de ionización (pK) de los compuestos.
 - Algunos efectos, p.e. daño epidérmico o endotelial agudo, serán aparentes incluso si la sustancia se aplica a animales recién muertos, por lo tanto compruebe primero y después considere la valoración de los efectos sobre un animal anestesiado.
- (ii) *Solubilidad:* Los materiales a inyectar pueden contener partículas o las sustancias pueden precipitar formando grandes partículas. Si la administración es intramuscular esto puede ser muy doloroso y puede impedir la absorción.
 - Idealmente se deben usar soluciones biocompatibles estables.
 - Antes de dosificar, compruebe si la formulación es de base acuosa u oleosa y si es estable porque probablemente precipitará. Si existe alguna posibilidad de que haya partículas en suspensión presentes o que la sustancia precipite, se puede intercalar un filtro (p.e. microporo) en la línea de inyección. Sin embargo, tenga en cuenta que el producto a ensayar puede perderse por el filtro o ser adsorbido sobre la superficie del mismo produciéndose una reducción de la dosis.
- (iii) *Biocompatibilidad:* las sustancias que no son biocompatibles pueden provocar lesión tisular.
 - Si es conveniente, utilice técnicas in vitro para identificar efectos adversos, p.e. efectos hemolíticos y citopáticos.
- (iv) *Viscosidad:* Los líquidos altamente viscosos pueden provocar malestar y son difíciles de inyectar, requiriéndose un mayor tamaño de aguja.
 - Intente no utilizar sustancias viscosas.

(v) *Esterilidad*: Las sustancias contaminadas pueden provocar infección y causar irritación en el lugar de inyección, lo que puede producir automutilación y en el peor de los casos, la muerte del animal.

- Todas las sustancias inyectables deben ser estériles – los métodos más prácticos de conseguirlo son habitualmente el autoclavado y la microfiltración. Utilice técnicas asépticas durante todo el proceso para minimizar los riesgos de introducir patógenos en el cuerpo junto con la dosis.

(vi) *Calidad, estandarización y estabilidad de la sustancia*: Todos estos factores pueden afectar los resultados experimentales.

- Compruebe que el compuesto es puro. Hay que evitar la contaminación con otras sustancias o microorganismos y evitar la variación tanto en lo que se refiere a los constituyentes del lote como en cuanto a la forma física y química de la sustancia (pe. distinta forma salina). Tenga en cuenta el número de lote para referencias futuras.
- La estabilidad de las sustancias puede ser mejorada mediante microencapsulación, que también puede ser utilizada para separar sustancias o reactivos incompatibles, para provocar la liberación controlada y sostenida o para enmascarar sabores amargos.

(vii) *Temperatura*: La inyección de sustancias frías, p.e. recién sacadas del frigorífico, pueden provocar malestar y shock.

- Caliente las sustancias a la temperatura ambiente, o mejor todavía, a la temperatura corporal, inmediatamente antes de la administración.

Uso de soluciones antisépticas

(i) Una capa de pelo espesa impide el contacto de los antisépticos con la piel. Una aplicación excesiva de solución antiséptica en la piel puede causar pérdida de calor corporal por evaporación, especialmente en pequeños mamíferos.

- Retire el pelo del lugar de aplicación o córtelo si fuera necesario, para permitir que el preparado antiséptico actúe eficazmente. Utilice estas preparaciones con cuidado.

Inyecciones

Los inyectores sin aguja se están utilizando cada vez más y debe promoverse su uso para la administración de sustancias a los animales.

(i) *Agujas*: La inserción de grandes agujas puede ser dolorosa y produce un excesivo daño tisular.

- Un anestésico tópico, p.e. crema EMLA (Astra Pharmaceuticals Ltd, Home Park, King's Langley, Hertfordshire, UK) puede reducir el dolor de la inyección (Flecknell *et al.* 1990). EMLA debe aplicarse 30-45 minutos antes de la inyección para que tenga un efecto pleno.
- Es importante adecuar el tamaño de aguja necesario para facilitar la inyección de la sustancia a la que produzca el mínimo dolor, esto es, se deben utilizar agujas con el menor grosor posible siempre que sean las apropiadas para una dosificación precisa (ver Tabla 3). El calibre de la aguja depende de la resistencia de los tejidos que tiene que penetrar (especialmente la piel) lo cual, a su vez, depende de la especie animal y del lugar de inyección.
- Cambie de aguja en cada animal para evitar la transferencia de infecciones. Compruebe que se usa siempre una aguja afilada.
- Si las administraciones se tienen que repetir a intervalos cortos de tiempo, considere la posibilidad de cateterizar la vena.

(ii) *Posicionamiento correcto y técnica de inyección*: Se pueden provocar efectos adversos graves si las agujas o las sondas se colocan de manera incorrecta, p.e. una inyección intramuscular inyectada intravenosamente puede ser fatal. Los tejidos pueden resultar dañados si las inyecciones no se hacen adecuadamente.

- Es esencial estudiar la anatomía de los animales, por ejemplo; las articulaciones para administraciones intra-articulares; la longitud del esófago para la canulación; la posición de los nervios para la administración intramuscular. Se puede lograr mayor precisión sobre la profundidad de la inserción mediante el uso de topes o marcas en las agujas/sondas.
- Introduzca la aguja/sonda firme pero suavemente y presione el émbolo con

Tabla 3. Tamaño de aguja para la administración de sustancias

Especie	Intradérmica	Subcutánea	Intramuscular	Intravenosa	Intraperitoneal
Ratón	27G	25G	27G	26-28G	25-27G
Rata	27G	25G	25G	25-27G	23-25G
Cobaya	25G	23-25G	25G	25-27G	23-25G
Hámster	25G	25G	25G	25-27G	23-25G
Conejo	25G	21-25G	25G	23-25G	21-23G
Hurón	25G	21-23G	23-25G	21-25G	21-23G
Perro	25G	21-23G	21-23G	21-25G	21-23G
Gato	25G	21-23G	23G	21-25G	21-23G
Grandes primates	25G	21-25G	23-25G	21-25G	21-23G
Pequeños primates	25G	23-25G	23-25G	21-25G	21-25G
Oveja	25G	19-23G	21G	19-21G	19-21G

Adaptada de Wolfensohn y Lloyd (1998).

suavidad. Una vez la aguja ha sido introducida aspire con el émbolo para asegurar que ésta no ha sido introducida, accidentalmente, en un vaso sanguíneo. Si entra sangre en la jeringa debe retirar un poco la aguja e introducirla en una nueva dirección, ya que los receptores del dolor están situados en la piel y realizar esta operación es menos doloroso que sacar la aguja y volver a inyectar. Después de la inyección saque la aguja lenta pero firmemente.

- (iii) *Pérdidas:* Los fluidos pueden salirse a través del punto de inoculación reduciendo la precisión de la dosis.
- Puede resultar mejor inyectar a cierta distancia del punto de inoculación, usando una aguja más larga. Tirando de la piel hacia un lado antes de introducir la aguja, la propia piel sellará la entrada e impedirá la pérdida. También sirve de ayuda masajear el lugar de inyección para dispersar el sustrato, así como aplicar presión sobre el lugar después de la inyección.
- (iv) *Hemorragias después de la inyección:* Los lugares de inyección pueden sangrar, especialmente después de la administración intravenosa.
- Aplique una presión suave pero firme con un algodón hasta que la hemorragia pare. Limpie los restos de sangre para prevenir que los animales se laman o muerdan en el lugar de la inyección.

Volúmenes / Tamaños de cápsulas

- (i) *Grandes volúmenes:* La administración de grandes volúmenes puede resultar difícil en la práctica y producir efectos fisiológicos adversos, comprometiendo el bienestar del animal.
- La dosis máxima en términos de volumen de fluido y tamaño de las cápsulas y pastillas varía dependiendo de la vía y de la especie animal. El requerimiento esencial es asegurar que el volumen dado produzca el mínimo malestar y no se traduzca en cambios fisiológicos o patológicos que pudieran comprometer el experimento. En lo que atañe al animal, cuanto menor sea el volumen de la dosis mejor (ver Tabla 4).

Uso de adyuvantes para mejorar la producción de anticuerpos.

- (i) Muchos adyuvantes pueden ser nocivos para los animales y producir lesiones patológicas importantes. La mayoría de la información sobre la eficacia de los diferentes adyuvantes es anecdótica, por lo que es difícil seleccionar la más apropiada (Jackson & Fox 1995, Animal Welfare Information Center 1997, Leenars *et al.* 1997, Palmer *et al.* 1997):
- Elija el adyuvante menos perjudicial.
 - Nunca se debe usar adyuvante completo de Freund (FCA) dos veces en el mismo animal. En el Reino Unido el uso de FCA requiere ser justificado ante el Ministerio del Interior.

Tabla 4. Líneas directrices: volúmenes máximos para las vías habituales de administración en las especies de laboratorio más utilizadas.

Vías y volúmenes					
Oral (ml /kg)	ip	iv ^a	im (ml/kg/por lugar)	sc ^b	id ^c (ml/por lugar)
10	10	5	0,05	2-5	0,05-0,1

El requerimiento esencial para determinar el volumen de dosis es que el volumen administrado debe minimizar cualquier angustia o problema de bienestar y no debe producir cambios fisiológicos o patológicos que comprometan el experimento. En lo que respecta al animal, cuanto menor sea la dosis mejor.

La mayoría de las guías aconsejan volúmenes diferentes para especies diferentes, pero en la mayoría de los casos no hay razones fisiológicas para hacerlo. Esto se tuvo en cuenta cuando se diseñó esta tabla de tal modo que se consideró una sola directriz para los volúmenes a aplicar a la mayoría de especies para una ruta determinada. Cuando se determinen volúmenes para especies poco habituales y otras vías habrá que considerar las características anatómicas y fisiológicas de las especies.

Notas: sc = subcutánea; ip = intraperitoneal; iv = intravenosa; id = intradérmica; im = intramuscular; iv^a = inyección del inóculo en un período relativamente corto de tiempo (aproximadamente 1 minuto); sc^b = El volumen depende de la flacidez de la piel del animal y por lo tanto, del potencial espacio subcutáneo. Para la administración de volúmenes mayores habrá que utilizar múltiples puntos de inoculación, pero si la administración es diaria, se debe aplicar en un máximo de cuatro puntos. Estos volúmenes son para inoculaciones sin adyuvante de Freund. El adyuvante de Freund limita el volumen a 0,1 ml de CFA por punto; id^c = El volumen depende del espesor de la piel que varía con el lugar y la especie. Máximo número de puntos = 6; im = Este es volumen para un único punto. La utilización de más de un punto en más de un miembro puede producir cojera múltiple; ip = Esta vía no es habitual en perros, aves ni primates.

- Inocule el menor volumen de adyuvante posible y no más de 100 microlitros en cada punto (utilice antígeno concentrado).
 - Elija el lugar de inyección donde la respuesta patológica local cause el menor dolor y pueda ser más fácilmente observada y tratada si fuera necesario (p.e. subcutánea).
 - Deje transcurrir largos intervalos entre reinmunizaciones (al menos 4 semanas).
 - Aproveche la memoria de respuesta de los anticuerpos.
 - Elija especies que proporcionen grandes cantidades de sangre (p.e. ovejas y cabras).
 - Planifique previamente y sea paciente, una buena producción de buen antisuero puede llevar 6 meses o más. Sin embargo, considere que los animales utilizados para producir anticuerpos no deben ser mantenidos por tiempo indefinido sin la necesaria justificación científica autorizada.
- evite el abandono. Manipule todos los jóvenes de la camada para que la madre no cree diferencias entre ellos.
 - Si es adecuado a la especie, saque a la madre antes de devolver las crías. Póngalas en la parte delantera de la cubeta y mézclelas con el lecho para ocultar olores extraños, después devuelva a la madre.
 - Minimice las molestias cuando observe los animales.

Inmovilización

Neonatos / Animales jóvenes

- (i) *Rechazo:* Los neonatos/animales jóvenes pueden ser rechazados o canibalizados por la madre después de ser manipulados.
- Conozca el comportamiento maternal de las especies.
 - Use guantes cuando maneje animales jóvenes para enmascarar los olores y evitar el abandono. Manipule todos los jóvenes de la camada para que la madre no cree diferencias entre ellos.
- (i) La sujeción puede ser tan estresante o más que el propio procedimiento, especialmente para animales que no están acostumbrados a ser manejados. Los periodos de retención en tubos o cepos provocan estrés. Es especialmente problemática la retención en tubos, pues si el tamaño o la forma no son los adecuados para los animales, éstos pueden girarse parcialmente y es probable que lleguen a angustiarse y morir.
- Utilice los procedimientos de sujeción más apropiados, es decir, menos estresantes para el animal y de menor duración (Poole 1987, van Zutphen *et al.* 1993, Tuffery 1995).
 - La habituación y/o el entrenamiento del animal puede reducir el estrés (ver Sección 2.1.4).

- Asegúrese que el personal está bien preparado en inmovilizar animales y relajarlos cuando están siendo sujetos; la sujeción debe ser firme pero delicada.
- Compruebe que el equipo, como por ejemplo los tubos de retención, son del tamaño y forma adecuada para el animal.
- Nunca se debe dejar desatendidos a los animales retenidos.

3 Refinamiento para cada una de las vías y procedimientos

Se proporcionan unas recomendaciones para el refinamiento de cada una de las vías más habituales teniendo en cuenta los problemas potenciales o las dificultades que se pueden encontrar relativas a la sustancia, a la técnica y al procedimiento en conjunto.

Se da un breve resumen de cada técnica, suficiente para identificar los procedimientos descritos. Solamente se proporciona una información más completa cuando no se dispone fácilmente de ella en otras publicaciones (ver Paget & Thomson 1979, Kirk & Bistner 1985, Poole 1987, Rollin & Kessel 1990, Waynforth & Flecknell 1992, Tuffery 1985, Wolfensohn & Lloyd 1998).

3.1 Intra-articular

Uso de la técnica

Este método se emplea para la administración local dentro de la cavidad de la articulación (normalmente en articulaciones rígidas) bien para comprobar la eficacia de las drogas diseñadas para tratamientos clínicos de enfermedades de las articulaciones, o para conseguir modelos de enfermedades articulares. La técnica tiene aplicación clínica en terapéutica veterinaria (Kirk 1980).

Resumen del protocolo

La técnica requiere que los animales permanezcan muy quietos. En todas las especies, es preferible utilizar anestesia de corta duración para inmovilizarlos, pero es esencial en roedores, conejos o perros. En especies mayores las inoculaciones se hacen utilizando anestesia local en el lugar de inserción de la aguja junto con una adecuada sujeción y sedación para evitar que el animal se mueva en el momento crítico.

Se debe retirar el pelo que está sobre la articulación, palpar la articulación rígida para

estimar la posición del espacio articular e insertar la aguja (separada de la jeringa) a través de la cara anterior de la articulación, p.e. a través o adyacente al ligamento rotuliano. A continuación se conecta la jeringa a la aguja y se inyecta la sustancia. La localización dentro de la cavidad puede inferirse porque se produce un rápido movimiento de la aguja hacia delante después que ésta ha penetrado la piel y la cápsula de la articulación de la rodilla. En animales grandes debe producirse un reflujo de líquido sinovial a lo largo de la aguja.

Problemas potenciales y refinamiento

La técnica puede ser muy dolorosa y puede dañar las superficies articulares si no se ejecuta con sumo cuidado. En cambio, la adecuada atención a la anatomía y la utilización de una técnica aséptica debe minimizar la incidencia de efectos adversos.

La colocación incorrecta de la aguja puede dañar los tejidos circundantes con el consiguiente dolor. El dolor puede producirse, incluso, aunque la aguja se haya insertado correctamente.

- Es esencial tener un buen conocimiento de la anatomía de la articulación.
- Se debe usar una aguja tan pequeña y fina como sea posible con respecto a las especies y la articulación, p.e. 26G x 3/8" para ratas. No es probable que sea necesario utilizar agujas mayores de 21G, incluso en especies tan grandes como el perro.

Si el animal se mueve la aguja dañará los tejidos sensibles dentro y alrededor de la articulación. Esto será doloroso y puede producir cojera.

- Asegúrese de que el animal esté inmóvil cuando realice el procedimiento. Utilice anestesia general. Si esto no fuera conveniente, acostumbre al animal al método de retención más adecuado para que se relaje y permanezca inmóvil durante la inyección.
- Observe al animal por si presentara síntomas de cojera después de completar el procedimiento. Adminístrele analgésicos, a menos que esto no comprometa seriamente el objetivo del estudio.

Si no se aplica una buena técnica aséptica se producirá una artritis séptica, que puede producir cojera, calor e inflamación de la articulación, lo que será extremadamente doloroso.

- Hay que evitar la sobre-distensión de la articulación por la aplicación de un volumen

excesivo de sustancia; cuando sea posible se extraerá un volumen igual de líquido sinovial antes de inyectar. El volumen máximo que puede administrarse (asumiendo que se ha aspirado un volumen equivalente de líquido sinovial) es de 15 µl para ratas (Waynforth & Flecknell 1992); 200 µl para conejos; 1 ml para perros.

Cuantas más veces se penetra la articulación por repetición de la dosis, mayor será el riesgo de producir una infección y de provocar un trauma.

- Como procedimiento científico individual, esta técnica solo debe utilizarse una vez y sobre una sola articulación.

3.2 Intracerebral (intracerebroventricular)

Uso de la técnica

Esta técnica se usa para liberar agentes farmacológicos al sistema nervioso central, bien cuando hay que superar la barrera hematoencefálica o bien para evitar los efectos sistémicos directos. La inyección intracerebral se usa también para aislar o ensayar microorganismos.

Resumen del protocolo

La vía se utiliza en roedores neonatos, adultos y en pollitos recién nacidos. En roedores se emplea un equipo estereotáxico para obtener una mayor precisión y minimizar el daño tisular.

Roedores neonatos y pollitos

Utilice una jeringa de plástico de pequeño calibre y volumen (menor de 0,5 ml) con una aguja de 27G. Introduzca el inóculo en la jeringa y compruebe que el émbolo funciona con suavidad (evitando la formación de burbujas) antes de incidir sobre el animal.

Los ratones, ratas y pollitos no deben tener más de tres días de edad. Sujete al animal suavemente en una toalla/almohadilla absorbente, sobre una superficie firme, con la parte dorsal del animal hacia arriba, sujetándolo con guantes entre los dedos pulgar e índice.

Se introduce la punta de la aguja en el cerebro, habitualmente desde el frente, con un ángulo de 45°, en el área de la fontanela craneal anterior (en lo alto de la línea media) y se presiona el émbolo de la jeringa suavemente para inyectar la dosis. Devuelva el animal a su madre, obsérvelo al cabo de una hora (para evitar excesivas molestias) por si se produjeran efectos adversos y vigílelo estrechamente, al menos una vez al día tras la

inyección, por si aparecen efectos adversos debido a la técnica o al inóculo.

Existe controversia sobre si es apropiado el uso de anestesia en animales de esta edad, ya que hay que valorar el malestar que produce la anestesia en sí, frente a la angustia que provoca la inoculación intracerebral. Sin embargo, los anestésicos modernos pueden ser administrados sin riesgo por personal competente y la anestesia tópica no debe producir ningún problema. La percepción del dolor en animales neonatos ha sido objeto de numerosas investigaciones y avances en los últimos años. En algunas especies, incluyendo las ratas y los humanos, la diferenciación de las fibras inhibitorias que mitigan la sensación de dolor y elevan el umbral del mismo, no se desarrollan hasta las 2-3 semanas después del parto, por lo que algunos neurocientíficos creen que los animales neonatos con el sistema nervioso inmaduro son más propensos a sentir dolor que los animales mayores. La actual tendencia a no usar anestesia en animales muy jóvenes es parte de una sabiduría obsoleta basada en que “las cosas pequeñas no sienten dolor”. También puede deberse a que los métodos de sujeción resultan tan relativamente fuertes que, o bien no nos damos cuenta que el animal está luchando, o bien lo atribuimos a una respuesta frente a la inmovilización.

Roedores adultos

Se necesita un equipo estereotáxico para asegurar que no se producen movimientos laterales de la aguja, lo que puede causar traumatismos. Por ello la anestesia es esencial, así como el que la técnica sea aséptica y el material estéril. El volumen de inyección no debe exceder del 2% del volumen del cerebro y se debe administrar siempre suficientemente lento para evitar el aumento de la presión del fluido cerebroespinal. La penetración del ventrículo se valora fácilmente por la repentina reducción de la resistencia a la presión en la línea de inyección. La colocación de una cánula fija permite efectuar inyecciones o infusiones intraventriculares continuas o sucesivas sin necesidad de anestesiar cada vez.

Problemas potenciales y refinamiento

Antes de usar esta vía debe considerarse siempre la posibilidad de utilizar métodos alternativos para obtener los resultados requeridos. El procedimiento no es fácil de realizar y los efectos adversos más frecuentes derivan de la deficiente ejecución de la técnica.

Hay que tener en cuenta que expulsar suavemente pequeños volúmenes de inóculo de una jeringa es una tarea difícil. El cráneo de los animales neonatos es muy delgado y frágil y puede dañarse fácilmente, lo mismo que el cerebro si se producen hemorragias en el lugar de inoculación. Cualquier movimiento del animal durante la inoculación producirá una lesión cerebral.

- Los animales neonatos requieren un manejo muy cuidadoso y suave, por lo que es imprescindible obtener una experiencia en su manejo, antes de comenzar los procedimientos. Para ejecutar el procedimiento sujete al animal suave pero firmemente. Se realiza con más facilidad si se coloca el animal en un paño sobre una superficie firme.
- Realice pequeñísimas presiones sobre el émbolo de la jeringa usando objetos inanimados frágiles (tales como esponjas artificiales) que logren la textura y presión necesaria para expeler los fluidos.
- Situando el volumen de inóculo en jeringas pequeñas se logra mantener un buen control ya que no es necesario estirar tanto el dedo para alcanzar el émbolo.

El animal puede morir si la aguja se coloca incorrectamente (p.e. si se inserta desde la parte posterior del cerebro, con un ángulo equivocado o demasiado profunda).

- Hay que conocer el lugar preciso donde inyectar al animal y a qué profundidad. Es conveniente colocar topes en la aguja o hacerla marcas para confirmar la profundidad.

Los tamaños de aguja mayores de 26G producen una excesiva lesión en el cerebro de los animales neonatos, lo que puede causarles la muerte.

- No utilice agujas mayores de 27G. Evite la inoculación de sustancias densas que requieran tamaños de aguja mayores.

La inyección de un volumen excesivo puede distender el cerebro y el cráneo.

- No inyecte más de 20 μ l en roedores neonatos.

Las sustancias con alto contenido proteico puede provocar la muerte del animal

- Compruebe siempre el contenido proteico de la sustancia a administrar y evite la vía intracerebral si el contenido en proteínas es alto.

Ocasionalmente la madre rechaza las crías cuando se las retorna. Si hubiera hemorragia en el lugar de la inyección puede canibalizarlas.

- Reduzca al mínimo las molestias a la camada después de la inoculación. Vigíelas al cabo de media hora o una hora y después una vez al día. Cualquier animal que muestre deficiencias neurales inesperadas, p.e. ataxias o parálisis, dentro de las primeras 24-36 horas debe ser sacrificado, ya que lo más probable es que sea debido a un fallo en la técnica. Ver también la Sección 2.3. (Neonatos/Animales jóvenes).

3.3 Intradérmica

Utilización de la técnica

La inyección intradérmica es una técnica utilizada frecuentemente en estudios de inflamación, sensibilización y diagnóstico de flujo sanguíneo cutáneo y en inmunología. A menudo el objetivo es administrar un antígeno de otra especie o un mediador inflamatorio y estudiar la reacción (edema, inflamación o enrojecimiento) que puede ocurrir rápidamente o después de un periodo de tiempo de minutos o días.

Resumen del protocolo

La inyección se hace entre las capas exteriores de la piel, normalmente del lomo. Se debe afeitar muy bien la piel dorsolateral, mediante afeitadora eléctrica (evitando cualquier daño en la misma) al menos una hora antes de la inyección. Se sitúa la aguja casi en paralelo a la superficie de la piel y se introduce cuidadosamente unos pocos milímetros dentro de ella. Si se produce una repentina pérdida de resistencia a la introducción de la aguja, lo más probable es que se deba a que la hemos insertado subcutáneamente. En este caso, retire la aguja y vuelva a introducirla. Si se hace una rotación de la aguja en el lugar de la inyección, justo después de la inoculación e inmediatamente antes de retirarla, se consigue minimizar la pérdida del fluido inoculado. Si la inyección se ha realizado correctamente observaremos la formación de un habón.

Problemas potenciales y refinamientos

Es muy importante realizar una sujeción afectuosa. Es esencial tener una buena técnica para asegurar que la administración es intradérmica en lugar de subcutánea.

Puede suceder que el volumen a administrar sea mayor que la cavidad natural en que se ha de depositar.

- El volumen a inyectar normalmente no debe exceder de 100 μ l por cada punto; en algunos casos es preferible que sea solo de 50 μ l.

Es fácil por error inyectar subcutáneamente en vez de intradérmicamente.

- Es esencial un buen entrenamiento para asegurar la correcta inyección. Ante la duda, recorte el pelo o afeite con cuidado el lugar de inyección para facilitar la visibilidad. Presione tan suavemente como sea posible. La formación del habón resultante de la inyección del fluido entre las capas cutáneas nos confirmará que la localización de la aguja es la correcta.

La densidad de la piel puede hacer difícil la inserción de la aguja.

- Utilice la aguja más pequeña y aguda que sea capaz de penetrar la piel (27G para roedores; 25G para perros y primates).

Una inyección intradérmica, incluso sin inflamación, puede provocar malestar si no se realiza correctamente.

- Se puede considerar el uso de un anestésico local en crema (p.e. crema EMLA).
- Minimice las reacciones adversas repartiendo la dosis sobre varios lugares (ver más abajo).
- No inyecte en un mismo lugar más de una vez.

La respuesta al inocular en diversos lugares puede coaligarse.

- El número máximo de lugares normalmente no debe exceder de 6.
- Procure que los lugares de inoculación estén lo suficientemente alejados para evitar la coalescencia. Considere el uso de anestesia, especialmente si se requiere inocular en más de 6 lugares.
- Cuando se ejecutan múltiples inyecciones utilice un diseño estadístico de tipo cuadrado latino para tener en cuenta las variaciones de espesor en las distintas zonas de la piel.

3.4 Intramuscular

Utilización de la técnica

En general la inyección intramuscular se utiliza como una vía de administración sistémica. Se usa a veces, en estudios de liberación lenta en los que se emplean implantes o formulaciones oleosas, para proporcionar una fuente desde donde la droga sea absorbida gradualmente. También se utiliza para valorar vacunas y para administrar anestésicos, especialmente en animales salvajes disparándoles con un arma.

Resumen del protocolo

Se necesitan dos personas, una para sujetar el animal y la otra para inyectar el material. La inyección debe hacerse en una masa muscular suficientemente grande, adecuada al propósito del procedimiento y lejos de los vasos sanguíneos y nervios mayores para evitar dañarlos.

Normalmente se hará entre la cara lateral y la craneal de los músculos del muslo (el grupo vasto) mejor que en la zona tendinosa de la extremidad posterior. El lugar de inyección en aves es en el muslo o en el músculo pectoral; en peces se utiliza la musculatura dorsal.

La pata del animal debe sujetarse firmemente introduciendo la aguja cuidadosa y decididamente. Debe tirarse ligeramente del émbolo de la jeringa antes de inyectar, para asegurarse de que la aguja no está dentro de un vaso sanguíneo. A continuación se inyecta lentamente el contenido de la jeringa, se retira la aguja y se masajea suavemente la zona.

Problemas potenciales y refinamientos

La inyección intramuscular parece causar más dolor que las inyecciones en otros lugares, tanto en ese momento como posteriormente, según se evidencia por la cojera temporal. También existe una mayor posibilidad de dañar inadvertidamente los troncos nerviosos mayores o los nervios intramusculares, así como de dañar el tejido muscular debido a la distensión del compartimento fascial cercano.

Esta vía debe usarse solamente, si no es posible utilizar una alternativa menos dolorosa o si se requiere clínicamente. La irritación potencial de una sustancia cuando se inyecta subcutánea o intraperitonealmente no debe servir de razón para elegir la vía intramuscular, ya que es igualmente probable que sea irritante. Antes de usar esta técnica hay que considerar cuidadosamente lo que se está intentando conseguir, la probable lesión, si hay otra alternativa, si la administración se realiza una sola vez o se van a requerir dosis repetidas.

Si se administran sustancias irritantes intramuscularmente, la necrosis tisular que se produce en el lugar de inyección probablemente será dolorosa, puesto que los músculos se utilizan constantemente para mantener la postura. El uso de adyuvante puede complicar el problema porque éstos constituyen un foco continuo de irritación (ver Sección 2.3).

- No utilice sustancias irritantes.
- Depile el lugar de inyección de modo que pueda verse cualquier reacción local. En las aves, las plumas pueden humedecerse con una solución alcohólica y separarse pero no arrancarse (ver también Hawkins *et al.* 2001). Esto es particularmente importante si existe algún peligro de que las sustancias sean irritantes.

La inyección en sí puede producir un serio malestar al animal.

- En estos casos, realice la inyección tan rápidamente como sea posible o, si la reacción al dolor llega a ser violenta, extraiga la aguja para evitar el dolor innecesario o daño físico. La inyección deberá completarse en otro lugar cuando la reacción al dolor haya disminuido y el animal se haya calmado.
- Reevalúe la necesidad de usar esta vía y la formulación.

Los nervios (p.e. el nervio ciático) pueden ser dañados por la colocación incorrecta de la aguja o por una reacción frente a la sustancia administrada. Los traumas cerca del nervio ciático pueden conducir a la automutilación en conejos. La sustancia puede inyectarse inadvertidamente en un vaso sanguíneo dentro de la masa muscular; también existe el riesgo de inyectar el material en la fascia, en lugar de en el músculo mismo, con lo que se introducirán variaciones experimentales.

Los movimientos de la punta de la aguja mientras está dentro del músculo pueden producir daños, p.e. cuando se tira hacia atrás del émbolo para comprobar que no se está dentro de un vaso sanguíneo.

- Mantenga al animal muy quieto. Una sujeción suave es fundamental, así como estar familiarizado con la anatomía, especialmente de las masas musculares y la disposición de los nervios.
- Ponga gran cuidado en evitar los nervios y los vasos sanguíneos cuando se introduce la aguja. El nervio ciático se encuentra profundo en la parte posterior (caudal) de la masa muscular femoral y a lo largo del hueso, por lo tanto es preferible inyectar en la masa muscular de la parte anterior del muslo. No introduzca la aguja demasiado (no más allá de 1,5 cm en gatos adultos y 2,5 cm en perros adultos).

El volumen inyectado puede distender el músculo produciendo una inflamación en el lugar

de la inyección, con la consiguiente lesión y dolor. Este es uno de los problemas principales en los pequeños mamíferos.

- El volumen que puede ser introducido sin problemas depende de las especies y de la forma y tamaño de los músculos. No use la técnica en animales pequeños (p.e. rata, ratón o hámster) a menos que se den circunstancias excepcionales, en cuyo caso, debe hacerse con extremo cuidado.
- Puede resultar más conveniente dividir los volúmenes grandes, por ejemplo entre las extremidades traseras y delanteras, o elegir 4 lugares y rotar entre ellos. Si embargo, también hay que tener en cuenta la eventualidad de provocar una cojera múltiple. Los puntos deben estar separados al menos 4 cm.
- Tras la inyección, realice un suave masaje para dispersar las sustancias acuosas.

Los mamíferos grandes (ovejas y bóvidos) se están normalmente quietos durante la administración si se utiliza una buena sujeción y una persona conocida por ellos, aunque no así los cerdos.

- Si se utiliza una aguja de tipo mariposa con un largo tubo de polietileno, la inyección se hará con mayor facilidad ya que el operador puede ir siguiendo al cerdo alrededor del corral mientras va inyectando al mismo tiempo.
- Será de gran ayuda alimentar al animal con algunos frutos secos mientras se realiza el proceso.

En peces la inyección puede desprender escamas.

- Puede ser necesario construir un retenedor con un bloque de goma espuma o esponja. Se hace un corte en forma de "V" en la superficie del bloque lo suficientemente grande para contener al pez. La "V" es recubierta con tejidos húmedos y todo el conjunto se empapa con agua (ver también Brattelid & Smith 2000).

3.5 Intranasal

Utilización de la técnica

La administración intranasal se utiliza cuando se investiga el tracto respiratorio como vía de infección y cuando se estudia la absorción de fármacos a través de la mucosa.

Resumen del protocolo

El producto a testar se administra depositando pequeñas gotitas en una o ambas fosas nasales

mediante una pipeta automática o por medio de aerosoles. Sólo puede utilizarse la técnica para administrar pequeños volúmenes (p.e. 50 µl a roedores y conejos, 500 µl a perros).

Los animales pequeños como los roedores se sujetan por la nuca, debiendo estar quietos y relajados y con las fosas nasales verticalmente hacia arriba. El orificio del dispensador se debe colocar alrededor de 1 mm por encima de las fosas, presionando el émbolo de la pipeta de modo que caiga una gotita dentro de la fosa. Si la gotita quedara adherida a la pipeta puede tocarse suavemente contra el orificio nasal para que caiga dentro de la fosa.

Para administrar a perros se necesitan dos personas: uno sujeta al animal en posición sedente (sentado), el otro (el que administra la dosis) eleva la cabeza del perro ligeramente sobre la horizontal (unos 30°). Para aplicarlo se utiliza una jeringa o aerosol que la persona que dosifica sujeta con la otra mano y sitúa a 2-3 mm de la nariz, sin tocar la mucosa. Se acciona la bomba del aerosol, normalmente una o dos veces y se retira. La cabeza del perro se mantiene ligeramente hacia arriba durante unos 30 segundos para permitir que el producto se deslice hacia la cavidad nasal. Si el volumen administrado es muy pequeño esto último no es necesario.

En primates se utiliza un procedimiento similar, aunque para grandes primates del Viejo Mundo son necesarias tres personas: dos para sujetar el animal y uno para aplicar la dosis.

Problemas potenciales y refinamientos

La técnica supone poco estrés si el animal está bien entrenado. Si falla el primer intento puede repetirse la técnica siempre que el animal permanezca relajado y no estresado.

La dosificación es casi siempre poco exacta puesto que el animal a menudo estornuda cuando se le administra. El estornudo puede contaminar a otros animales o al personal con el producto a ensayar.

- Dosifique a los animales lejos del resto y prevea la falta de precisión cuando se calcule la dosis.

Si el animal se mueve, una parte del material puede no entrar en el orificio nasal o bien la pipeta puede impactar en la nariz hiriendo al animal.

- Entrene a los animales para que se acostumbren a la sujeción y dosificación (p.e. con suero fisiológico) antes de comenzar el estudio. Mantenga al animal muy quieto con

el dispositivo de administración muy cercano a la nariz (p.e. como 1 mm) o dentro de ella. Es conveniente utilizar una anestesia/sedación breve cuando se administra una única dosis o cuando se dosifica a pequeños roedores.

- Para esta técnica se necesita un pulso firme. Practique la técnica dosificando en un pequeño contenedor y compruebe pesando la dosis aplicada.

3.6 Intraperitoneal

Utilización de la técnica

La inyección intraperitoneal se utiliza para administrar volúmenes relativamente grandes de sustancias solubles, tales como los anestésicos, a pequeños animales, cuando es necesario que se absorban rápidamente y cuando la vía oral o la intravenosa no son las apropiadas. Es una vía habitual para la administración de sustancias a peces.

Resumen del protocolo

La técnica implica la inyección en la cavidad peritoneal a través de la pared abdominal. Está descrita detalladamente para ratas en Waynforth y Flecknell (1992).

Para peces, la inyección intraperitoneal se aplica mejor antero-lateralmente al ano, midiendo la profundidad de penetración manteniendo una ligera presión sobre la jeringa. La penetración debe cesar tan pronto como el fluido inyectado empiece a fluir libremente indicando la presencia de la aguja en la cavidad peritoneal.

Problemas potenciales y refinamientos

Esta vía no debe utilizarse rutinariamente (excepto para la administración de ciertos anestésicos) mientras haya otras vías accesibles y más adecuadas al objetivo de la investigación.

La técnica no se recomienda para animales mayores que los roedores ni para hembras preñadas, puesto que la aguja puede penetrar el útero grávido. No utilice nunca esta técnica con aves porque la sustancia puede penetrar en los sacos aéreos.

Las sustancias irritantes pueden poner en peligro la vida del animal si se administran por esta vía. Pueden producir reacciones manifiestas en la cavidad peritoneal incluyendo dolor, formación de tejido fibroso y adherencias. Muchos disolventes no acuosos pueden producir inflamación de los bordes de los lóbulos hepáticos.

- Tenga muy en cuenta el pH, la capacidad irritativa, la toxicidad y la compatibilidad de la sustancia (ver Sección 2.3). Se aconseja la realización de estudios piloto.

Es una técnica difícil de ejecutar correctamente, especialmente en pequeños roedores (Lewis *et al.* 1996, Claasen 1994), porque no se puede asegurar que la dosis se esté administrando en la cavidad peritoneal en lugar del intestino, vejiga urinaria, músculo u otro órgano. Ocasionalmente se pueden dañar vasos sanguíneos produciendo hemorragias.

- Es esencial la buena preparación del personal. Para evitar perforar las vísceras abdominales introduzca la aguja rápidamente con un ángulo de 30°, ligeramente a la izquierda de la línea media del ombligo, a medio camino entre la sínfisis pubiana y el apéndice xifoides del esternón (ver Waynforth & Flecknell 1992). En roedores puede ejecutarse mejor la técnica sujetando a los animales con la cabeza inclinada hacia abajo. Observe que con esta técnica la aspiración con el émbolo normalmente no es conveniente puesto que el contenido intestinal es demasiado denso para que pueda entrar en la aguja.

Las inyecciones de volúmenes de sustancia demasiado grandes distienden el abdomen y provocarán malestar.

- El volumen de inyección depende del tamaño del animal y de lo que pueda albergar. Como guía se puede estimar unos 10 ml/kg.

El uso repetido de esta técnica puede producir un serio estrés debido a la necesaria inmovilización, los efectos irritantes acumulativos, el daño de la aguja y el riesgo potencial de inyectar en los órganos abdominales.

- No inyecte más de una vez por día a un mismo animal. El número de inyecciones subsiguientes deberá estar rigurosamente justificado. Una anestesia de corta duración puede hacer la técnica más fiable y menos estresante.
- Cuando se requiera una administración repetida/continua (por ejemplo cuando se utiliza para simular la diálisis peritoneal ambulatoria en humanos), considere si pudiera ser menos estresante implantar a los animales una minibomba dosificadora (ver Sección 3.11)

3.7 Intratraqueal

Utilización de la técnica

La administración intratraqueal se utiliza para estudiar en las vías respiratorias de los animales de laboratorio los efectos de sustancias escasamente solubles (p.e. polvo y fibras).

Resumen del protocolo

La técnica se utiliza normalmente con hámster, rata, cobaya y conejo. Supone la administración en la tráquea por cavidad oral, o en los pulmones por traqueotomía, de una dosificación repetida. Hay muchas referencias que describen la técnica en ratas y conejos (ver Sedgwick 1988, Waynforth & Flecknell 1992, Cambrón *et al.* 1995, Davies *et al.* 1996) y primates (Morris *et al.* 1997). En la presente publicación no se trata la traqueotomía en sí.

El animal debe anestesiarse y posicionarse en *decúbito supino* sobre una mesa almohadillada. La intubación debe efectuarse con un tubo de un tamaño adecuado (p.e. tubo endotraqueal), el extremo roto desinflado es conducido hacia la tráquea con un laringoscopio. Es importante comprobar la correcta colocación por el movimiento de aire inspirado y expirado a través del tubo. La sustancia a ensayar se introduce en una jeringa que se fija a un catéter intravenoso. El catéter se introduce entonces dentro del tubo endotraqueal (que actúa como guía) y se inserta en el punto de bifurcación de las vías respiratorias. Su colocación puede detectarse con facilidad.

Una técnica alternativa que se puede utilizar en ratas consiste en colocar al animal anestesiado apoyado sobre el esternón con la mandíbula inferior sujeta por detrás de los incisivos y la mandíbula superior elevada con una banda elástica colocada detrás de los incisivos. Así se mantiene una boca ampliamente abierta para permitir visualizar la laringe por medio de un otoscopio canino adaptado (Sedgwick 1988). Entonces se puede hacer pasar un catéter flexible de una longitud adecuada a través de la laringe para instilar la sustancia. Una luz de fibra óptica apoyada sobre el cuello a nivel de la laringe, puede ayudar a la exploración de la faringe.

Problemas potenciales y refinamientos

La administración intratraqueal requiere anestesia general, por lo tanto, antes de utilizar esta vía piense detenidamente si esta vía es realmente necesaria o si pueden lograrse resultados satisfactorios administrando la sustancia intranasalmente o por instilación.

La técnica tiene riesgo de dañar el tracto respiratorio y no es apropiada para administraciones repetidas. Si es absolutamente necesaria debe considerarse la realización de una traqueotomía.

El hecho de introducir cualquier material extraño, directamente en el tracto respiratorio puede causar reacciones adversas. Las materias irritantes pueden provocar serios problemas.

- Tenga en cuenta que el pH y otros factores pueden producir irritación. Evite el uso de materias irritantes (ver Sección 2.3).

La presencia física de la sustancia, especialmente en grandes volúmenes o cantidades de sólidos puede dañar la faringe o provocar irritación local en los pulmones.

- No exceda del volumen máximo de 500 µl para conejo y 40 µl para ratas. El tamaño máximo de partícula de sólidos administrados debe ser tal que no obstruyan las vías respiratorias y no produzca irritación mecánica de las vías a su paso.

La lengua puede resultar dañada si no se maneja con cuidado. La faringe/laringe puede dañarse con el paso del tubo produciendo laringoespasmos.

- Tenga precaución al manejar la lengua y cuando introduzca los tubos. Es fundamental un buen conocimiento de la anatomía de los animales, así como un entrenamiento adecuado (p.e. utilice animales recién muertos).
- Lubrique el tubo con una solución acuosa lubricante estéril (Davies *et al.* 1996). Un anestésico local en aerosol puede reducir el riesgo de laringoespasmos.
- Vigile estrechamente al animal durante el periodo de recuperación y durante las 3 horas siguientes.

3.8 Intravaginal

Utilización de la técnica

Las aplicaciones de esta técnica son limitadas puesto que se utiliza para imitar la vía de exposición a agentes patógenos (p.e. herpes, afta), a productos farmacéuticos o a otros productos tales como DIUs, tampones o pesarios.

Resumen del protocolo

A los roedores, conejos, perros y primates se les pueden administrar fluidos viscosos y cremas mediante una jeringa estéril insertada suavemente

entre los labios de la vulva, desplazándola hacia arriba y adelante en el interior del lumen vaginal. Para conejos y roedores, en lugar de la jeringa, puede utilizarse un catéter oral de una longitud aproximada de 10 cm.

Para administrar un óvulo vaginal, se sujeta éste entre el índice y el pulgar y se introduce suavemente entre los labios de la vulva hasta la vagina. Se consigue una introducción más profunda, empujando el pesario o el óvulo hacia la vagina, utilizando el dedo índice o algún tipo de sonda como puede ser una varilla de plástico suave.

Problemas potenciales y refinamientos

Las sustancias pueden ser absorbidas a través de la mucosa vaginal pudiendo provocar una toxicidad sistémica no deseada.

- Antes de dosificar conviene buscar si hay datos disponibles sobre las tasas de absorción para valorar los posibles efectos adversos.

Principalmente en pequeños animales puede resultar difícil conseguir el acceso a la vagina y se corre el riesgo de acceder por error al orificio uretral. También existe el riesgo de atravesar la pared vaginal con la jeringa o la varilla si el ángulo de penetración es incorrecto.

- Tenga gran cuidado cuando introduzca algo en la vagina. Es importante tener un detallado conocimiento de la anatomía del animal y en particular de la longitud de la vagina y la posición del orificio uretral. Durante la introducción, conviene situarse en la cara superior (dorsal) a fin de evitar la apertura uretral. Es importante tener en cuenta la posición del cuello del útero (cérvix) dentro de la cavidad pélvica e introducir la jeringa suficientemente dentro (p.e. 8,5 cm en una perra de 6-15 kg) para que la sustancia quede retenida en la vagina.
- Para comprobar que la sustancia no está en la uretra, aspire ligeramente con el émbolo de la jeringa y observe que no aparece orina en la misma. Es menos probable que un catéter más ancho quepa en la uretra.
- Puede resultar útil dilatar la vagina con un espéculo adecuadamente lubricado ¡y templado! (p.e. de plástico). Debe ser introducido suavemente entre los labios de la vulva y desde allí dentro de la vagina. Un suave cierre de las asas del espéculo provocará la dilatación de la vagina permitiendo así una fácil administración de la dosis con los dedos, un tampón o un tubo.

El animal puede empujar el óvulo hacia afuera o bien puede salirse éste si se introduce incorrectamente.

- Vigile al animal a intervalos, después de devolverlo a su jaula para asegurarse de que no se ha salido (pero recuerde que el óvulo eyectado puede ser tragado).

Si el volumen es grande puede ocurrir que el animal no retenga toda la dosis con lo que desconoceremos la dosis real administrada.

- Utilice volúmenes pequeños: menos de 3 ml en perras, de 500 µl en conejas y menos de 50 µl en roedores.

3.9 Intravenosa e intra-arterial

Utilización de la técnica

La vía intravenosa se utiliza con frecuencia en experimentos fármaco-toxicológicos para simular la vía de exposición a formulación de drogas, productos de reposición de la sangre, soluciones de nutrientes y agentes infecciosos y de diagnóstico. La vía asegura la consecución de la máxima exposición al plasma de la forma más rápida posible y evita la posibilidad de eliminación por el metabolismo preenterohepático.

La vía intra-arterial se utiliza raramente, excepto para valorar las posibles consecuencias de inyecciones intra-arteriales accidentales de una formulación que en principio se pretendiera por vía intravenosa.

Resumen del protocolo

Dosificación intravenosa: Puede encontrarse una descripción detallada de la vía en ratas en Waynforth y Flecknell (1992) con información

adicional sobre otras especies comunes de laboratorio en Paget & Thomson (1979) y Tuffery (1995). Se ha publicado más información sobre métodos actualizados y refinados en revistas como *Laboratory Animals*, *The Toxicologist* y en *Human & Experimental Toxicology*. Los principios de refinamiento son similares a los que se aplican para extraer muestras de sangre y por lo tanto otra referencia útil es también el documento publicado por BVA/AWF/FRAME/RSPCA/ UFAW sobre extracción de sangre (Morton *et al.* 1993) también traducido al español.

En la mayoría de los casos de administración intravenosa, las sustancias se introducen mediante una única inyección en la vena periférica más adecuada. La Tabla 5 indica los lugares y volúmenes recomendados para las diferentes especies. Siempre se necesita un cierto grado de inmovilización.

Administración Intra-arterial: Las recomendaciones relativas a la toma de muestras de sangre arterial (ver más arriba) también pueden ser útiles para la administración de sustancias por esta vía.

Se utiliza en conejos y perros y la sujeción es siempre necesaria. Para conejos un sedante o neuroleptoanalgésico suele dar mejor resultado que la sujeción física. Los perros deben ser anestesiados. Los lugares habituales son la arteria central de la oreja en conejos y la arteria femoral en perros. Los tamaños de aguja y los volúmenes de administración son similares a los recomendados para la dosificación intravenosa. Las inyecciones deben hacerse en condiciones asépticas, en la misma dirección que fluye la sangre y se debe administrar a un ritmo lento y constante durante unos 30 s.

Tabla 5. Inyecciones intravenosas (lugares de inyección, tamaños de aguja y volúmenes máximos)

Especies	Catéter adecuado/tamaño de aguja	Vena habitual (ocasional) para inyección
Ratón 20-25 g	25-27G x 5/8"	Cola
Rata 200 g	23G x 1"	Cola
Conejo 2,5 kg	21G x 1"	Marginal de la oreja
Perro 6 kg	21-25G hasta 1"	Cefálica (safena)
Primate	21-25G hasta 1"	Cefálica (safena)
Aves	21-25G x 1"	Braquial (yugular)
Aves acuáticas/paloma	23-26G x 1"	Tarsiana

La elección de los dispositivos de infusión está determinada en parte por el volumen que se va a infundir, la tasa de administración y las especies.

Pueden utilizarse agujas de mayor calibre para los animales más grandes de cada especie.

El volumen máximo debe ser normalmente del 4% y nunca mayor del 5% del volumen de sangre circulante.

Los volúmenes de infusión deben basarse en los datos sobre la función renal. Generalmente estarán alrededor del 5% del volumen de sangre circulante por hora o de 4 ml/kg/h.

Técnicas de infusión: Las técnicas de infusión (ya sea intermitente o continua) pueden utilizarse como alternativa a las inyecciones repetidas, pero es una técnica que hay que reconsiderar muy cuidadosamente, porque existen problemas inherentes de bienestar relacionados con la cirugía; la implantación de catéteres internos puede requerir un procedimiento quirúrgico que debe realizarse bajo anestesia. Otros problemas de bienestar están relacionados con la inmovilización mediante ataduras, el uso de chaquetas, arneses, jaulas con el medio ambiente restringido y el alojamiento individual.

Las técnicas de infusión se encuentran en un ámbito de desarrollo que excede el de este documento. En la bibliografía se puede encontrar descripciones detalladas sobre los aspectos prácticos de infusión (ver Gregory 1995, van Wijk 1997, Laboratory Animal Science Association 1998, Healing & Smith 2000).

Problemas potenciales y refinamiento

En esta vía hay muchos factores que pueden comprometer los objetivos experimentales e incrementar la severidad del procedimiento.

La sustancia

La capacidad tamponadora de la sangre permite la lenta administración de soluciones con un amplio rango de pH (entre 2-11) siempre que el contacto con las paredes de los vasos sanguíneos no sea prolongado. Las formulaciones para inyección deben ser miscibles con sangre sin que precipiten. Las sustancias no deben causar hemólisis o coagulación ni generar reacciones degenerativas o inflamatorias en las paredes de los vasos sanguíneos o tejidos perivasculares circundantes.

Algunos materiales pueden dañar los vasos sanguíneos en el punto de inyección.

- Considere la posibilidad de alterar la formulación (p.e. aumentando la dilución) y/o alterando el vehículo. Si no fuera posible, intente entonces hacer pasar un flujo de suero fisiológico a través del equipo y los vasos sanguíneos, antes y después de la administración de la sustancia de ensayo utilizando un conector en " T " unido a dos jeringas.

Las consecuencias de la administración intra-arterial de productos químicos irritantes de tejidos y de sustancias artero constrictoras son potencialmente catastróficos.

- No administre nunca tales sustancias por esta vía. Es esencial realizar pruebas de compatibilidad con la sangre previas a la dosificación. Asegúrese que no hay riesgo de hemorragia arterial subsiguiente al finalizar el procedimiento.
- Diluya siempre bien las sustancias utilizando una formulación adecuada y lave la arteria con suero fisiológico después de la inyección.

En algunas especies pueden producirse reacciones imprevistas. Por ejemplo, algunos componentes de formulaciones (Tween 80, polivinilpirrolidina, algunos liposomas) producen reacciones de tipo anafiláctico cuando se administran i.v. a perros, pero no producen ninguna reacción en roedores o humanos.

- Estudie los efectos potenciales de la sustancia y su vehículo con los datos existentes para diversas especies.

En las sustancias a inyectar pueden estar presentes partículas en suspensión o sustancias inadecuadas que pueden precipitar desde el momento de la preparación hasta el de la inyección.

- Filtre el material, p.e. incluyendo un filtro en la línea de inyección entre la jeringa y el vaso sanguíneo (Nota: los filtros pueden adsorber y retener el material de ensayo).

Si la sustancia ya no está en solución cuando se inyecta en la vena de la cola, la cola puede amoratarse debido a la trombosis. También puede producirse edema pulmonar y/o una embolia.

- Hay que estar seguro de que la sustancia está adecuadamente disuelta en un disolvente apropiado y comprobar su compatibilidad con la sangre antes de empezar el procedimiento.

El efecto de un compuesto puede estar influido por la velocidad de administración. Si se inyecta intravenosa o intra-arterialmente durante unos cuantos segundos, se producirán altos niveles de la sustancia en sangre de forma transitoria, con la posibilidad de que se produzcan rápidos efectos tóxicos.

- Es preferible inyectar las sustancias más lentamente durante un periodo de varios minutos. Para ello pueden necesitarse procedimientos de inmovilización distintos de la sujeción manual, por lo tanto conviene sopesar las desventajas de éstos contra los beneficios de inyectar más lentamente.

Volúmenes

La adición de grandes volúmenes de fluido a la corriente sanguínea producirá hemodilución, incremento de la presión venosa central, alteraciones en el equilibrio ácido/base y diuresis. También puede provocar edema pulmonar. Con soluciones no acuosas habrá problemas adicionales de toxicidad y hemólisis.

- Tenga en cuenta los valores de los volúmenes sanguíneos de las diferentes especies. Para minimizar los efectos adversos, evite el incremento del volumen sanguíneo en más del 4% por la inyección rápida de los bolos (ver Tabla 5) o al infundir más de 4 ml/kg/h.

Técnica de inyección

Si el animal se mueve durante el transcurso de la inyección, sacando la aguja del vaso sanguíneo, una parte del líquido de ensayo puede ser inyectado perivascularmente y/o subcutáneamente produciendo una tumefacción de la piel adyacente a la vena/arteria.

- Antes de ejecutar el procedimiento compruebe siempre que el animal está adecuadamente sujeto y que la aguja está firmemente conectada a la jeringa. La utilización de un catéter conectado a la aguja o una aguja de mariposa con un tramo de tubo de conexión reducirá el riesgo de que la aguja se desplace. Si el animal se mueve, compruebe la posición de la aguja. Si se hubiera salido de la vena, retírela inmediatamente y repita la inyección en un lugar diferente.
- Utilice una crema anestésica local, p.e. EMLA (Flecknell *et al.* 1990) con el fin de que el animal no sienta ningún dolor, reduciendo así el riesgo de que se mueva.
- Si se produce la inyección perivascular y la solución fuera irritante, contrarreste los efectos, p.e. inyectando en la zona un tampón salino como diluyente y anestesia local.

Una mala técnica de administración puede dañar el vaso haciendo difícil las inyecciones subsiguientes.

- Cuando se utilice la vena de la oreja se debe realizar la primera inyección tan cerca de la punta como sea posible para que la vena permanezca evidente. En roedores la inyección se hace cerca de la punta de la cola mejor que en la base de ésta, ya que habitualmente resulta más fácil y por lo tanto más precisa.
- Si hubiera que repetir las dosis, se deben rotar los lugares de inyección.

La inyección intravascular puede dar lugar a la formación de émbolos (p.e. fragmentos de piel) que se depositan en los pulmones. Raramente son de importancia clínica, pero puede afectar a la histopatología.

- Utilice una aguja fina e inyecte con el menor traumatismo posible.

Localización de la vena / elevación de la temperatura del animal

La vena puede ser difícil de ver.

- Intente dilatar los vasos para hacerlos más visibles frotando su superficie, calentando la oreja o cola (p.e. en una caja caliente) o utilizando algún sedante, p.e. Hypnorm® (Janssen Pharmaceutica, Turnhoutsebaan 30, 2340 Beerse, Bélgica) en conejos. Corte el pelo con cuidado para mejorar la visibilidad.

El animal puede sufrir un sobrecalentamiento si se utiliza calor intenso durante mucho tiempo.

- Cualquier técnica para calentar al animal debe asegurar un cuidadoso control de la temperatura máxima. Si se calienta solamente la cola se reduce la probabilidad de causar problemas, aunque el calor aplicado localmente no produce tan buenos resultados como cuando se calienta todo el cuerpo.
- No utilice secadores de pelo o lámparas de calor porque pueden sobrecalentar a los animales y producirles quemaduras de piel.

Cuando se utiliza una cámara para calentar, puede fallar el termostato produciendo un sobrecalentamiento de los animales, un innecesario estrés y en casos extremos, la muerte.

- La temperatura de la cámara no debe exceder de los 37°C. Calibre y controle la temperatura de la cámara cuidadosamente y asegúrese que el termostato tiene un buen control. Observe a los animales constantemente por si manifestaran síntomas de malestar. El periodo máximo de exposición al aplicar calor en el caso de ratones es de 5 minutos y de 15 minutos para ratas. Como norma, no se deben colocar al mismo tiempo, más de cinco animales por caja.

Técnica de infusión

Puesto que implica cirugía, se deben aplicar todos los refinamientos de las técnicas quirúrgicas, p.e. el uso apropiado de anestesia, asepsia, métodos adecuados para cerrar heridas y vendajes, condiciones del postoperatorio y analgesia

postoperatoria. Más adelante se enumeran algunos problemas potenciales y sugerencias para el refinamiento, no obstante, para más detalles, acuda a la bibliografía.

Las técnicas quirúrgicas para la implantación de catéteres o dispositivos de infusión pueden dañar al animal y producir infecciones.

- Asegúrese de que el personal está preparado para realizar la anestesia, la cirugía y los cuidados posteriores necesarios, incluyendo las técnicas asépticas.
- Reduzca los traumas postoperatorios acostumbrando a los animales al sistema de inmovilización durante varios días antes de la cirugía.
- Antes de seguir adelante, analice de qué modo puede verse afectado el comportamiento del animal debido a la cateterización y exteriorización del catéter.

El contacto constante o frecuente del catéter con el vaso sanguíneo puede producir una tromboembolia.

- Es esencial la correcta colocación del catéter, así como que en ella participe un veterinario con experiencia. Asegúrese de que el personal tiene la formación adecuada y es plenamente capaz de desarrollar el procedimiento.
- Es fundamental la utilización de materiales biocompatibles.

Pueden surgir problemas técnicos con el equipo de infusión, p.e. si se administran pequeños volúmenes a intervalos las bombas pueden no ser precisas.

- Compruebe que las bombas están en correcto funcionamiento cada vez que se vayan a usar.
- Asegúrese que los procedimientos de control de calidad son los adecuados, de forma que el aparato seleccionado proporcione el volumen correcto de formulación y a la velocidad de flujo requerida. En la actualidad existen sofisticados sistemas controlados por ordenador, que permiten el control remoto de las bombas preprogramables de infusión.
- No utilice dispositivos mecánicos de bombeo para ratones, ya que la velocidad de flujo en animales tan pequeños no puede controlarse adecuadamente.

El uso de sistemas de ataduras o chaquetas pueden resultar incómodo, restringir los

movimientos del animal o limitar sus posibilidades de relación social durante su alojamiento.

- Son más adecuadas las técnicas que permiten que el animal porte la bomba y el depósito con la solución a dosificar porque evitan la inmovilización. Utilice chaquetas que permitan el alojamiento en grupo de las especies más sociables o rediseñe las chaquetas si no existe ninguna suficientemente adecuada.
- Vigile diariamente el ajuste de las chaquetas y ataduras.
- Para infusiones discontinuas use implantes subcutáneos con conector exterior, para que no sea necesario sujetar al animal cuando no se le está infundiendo.

3.10 Vías orales

Utilización de la técnica

La vía oral se utiliza generalmente cuando se necesita una exposición sistémica, se sabe que la absorción gastrointestinal es buena y hay un escaso metabolismo de primer paso (first-pass metabolism) en el hígado. Se utiliza frecuentemente en investigaciones toxicológicas a pesar del metabolismo de primer paso. Se utiliza también cuando se estudia un efecto local en el tracto gastrointestinal.

Las sustancias puede introducirse en la boca o el estómago del animal mediante:

- (i) Inclusión en comida o agua; este método es el que más se asemeja a la ingestión de sustancias en humanos y es particularmente adecuado cuando se requiere una administración del compuesto de larga duración, p.e. en ensayos carcinogénicos.
- (ii) Administración orofaríngea de cápsulas, píldoras o fluidos; este método se utiliza cuando un producto es poco palatable (tiene mal sabor) o cuando se necesita una mayor precisión en la dosis.
- (iii) Sonda oral; esta técnica también evita los problemas de palatabilidad y es el método más preciso para la administración de sustancias en el tracto gastrointestinal.

El método de elección dependerá de la especie, los requerimientos nutricionales, estado fisiológico de los animales, propósito del experimento y la precisión de dosis que se requiera.

3.10.1 Inclusión en la comida o bebida del animal. Resumen del protocolo

La sustancia se incorpora en la comida o en el agua de bebida del animal. El animal consume voluntariamente la sustancia altamente palatable si le es ofrecida de este modo, o bien puede lamer del extremo de un aparato de dosificación como es una jeringa. Cuando los animales rehúsan la comida, es fundamental entender sus hábitos alimenticios para determinar el mejor modo de incorporar la sustancia en la dieta. Puede ser necesaria la realización de un estudio piloto para comprobar la aceptación de la sustancia.

Problemas potenciales y refinamiento

Este es el método menos estresante de administración de sustancias, pero a la vez puede que sea el menos preciso. Pueden surgir problemas relacionados con las propiedades físico-químicas de la sustancia, su palatabilidad y el comportamiento alimenticio de las especies. Sin embargo, la facilidad de administración, junto con el bajo nivel de estrés sobre el animal, puede compensar muchas de las desventajas.

Propiedades de la sustancia y su palatabilidad

La estabilidad de la sustancia o su homogeneidad en la dieta pueden producir una variedad de problemas prácticos y científicos y alterar su farmacocinética.

La sustancia puede; unirse a ingredientes en la dieta; ser alterada por el calor del proceso si se prepara en forma de *pellets*; reaccionar con otros componentes de la dieta, por ejemplo con vitaminas esenciales o aminoácidos, haciendo que no estén disponibles para el animal; o descomponerse en compuestos derivados más o menos tóxicos (ver Secciones 2.1.3 y 2.3).

Las sustancias irritantes pueden dañar la mucosa del esófago y estómago.

- Es esencial tener un detallado conocimiento de las propiedades de la sustancia con relación a la vía de dosificación.
- Compruebe siempre los datos existentes, buscando indicadores de probables efectos adversos sobre la especie utilizada.
- No utilice materias irritantes.

La sustancia puede ser poco palatable. Si aporta un sabor desagradable a la comida o al agua, los animales la consumirán menos. Si los animales la

rehúsan, puede ser necesario restringirles la dieta normal.

- Una cuidadosa preparación de los componentes, p.e. mediante microencapsulación, puede eliminar muchos de los problemas de palatabilidad.
- Enmascarar los sabores desagradables en agua añadiendo azúcar (las botellas de agua con solución azucarada deben cambiarse diariamente para minimizar el crecimiento microbiano). Otra opción es utilizar gelatina aromatizada (p.e. grosella, naranja) que parece gustar a las ratas y otros animales. La gelatina tiene un punto de fusión de alrededor de 60°C, pero un punto de solidificación alrededor de 25°C, lo que puede ser utilizado para disolver sustancias solubles en agua (o sustancias disueltas en una solución miscible) que sean termosensibles. La solución preparada de un compuesto puede ser añadida a la dieta para dar una concentración final adecuada que el animal comerá a gusto y sin vacilación.
- No restrinja la comida normal durante periodos largos y tenga en cuenta siempre la tasa metabólica, la edad y la condición de los animales antes de hacerlo.

Las sustancias pueden producir problemas dentales, p.e. alimentar a perros con mezclas húmedas durante periodos prolongados puede conducir a acumulación de sarro en los dientes. En roedores una dieta molida demasiado áspera puede provocar gingivitis, caries y perforación faríngea.

- No los alimente con *pellets* que sean demasiado duros.
- Vigile la dentición de los animales regularmente para comprobar que no tengan problemas dentales.

La sustancia puede tener un valor nutricional limitado y sin embargo constituir una gran proporción de la comida. Esto alteraría el balance normal de la dieta (p.e. los niveles de vitamina, proteína, etc.). En estudios con roedores se pueden añadir a la dieta hasta el 10% de sustancias no nutritivas.

- Sea consciente de los requerimientos nutricionales y el estado fisiológicos de los animales (p.e. animales en crecimiento, gestación o lactación). Contrólelos estrechamente por si hubiera signos de alteración de las condiciones normales o pérdida de peso.

Especies “quisquillosas”

Algunas especies (p.e. primates no humanos) detectan fácilmente inclusiones en la dieta. Los gatos también son comedores quisquillosos por lo que resulta difícil esconder las sustancias en su comida. Los cerdos tienen un sentido del gusto y olfato altamente desarrollados lo que da lugar a problemas similares. Las ratas y ratones también pueden rechazar las nuevas sustancias.

- Es esencial familiarizarse con los hábitos alimenticios y preferencias de cada especie.
- A los primates se les puede entrenar con técnicas de alimentación que surtan el efecto deseado. Dado que beben fácilmente los zumos de frutas se pueden disolver las sustancias en estos zumos y dárselas directamente. Las sustancias líquidas pueden ser inyectadas en una uva, una naranja o una rodaja de plátano. Los sólidos en polvo pueden ir bien mezclados con su “golosina” favorita; ésta deberá ser suficientemente pequeña para que el animal la consuma rápidamente sin tener que darle varios mordiscos (Schrier 1997).
- Los perros comen los alimentos rápidamente, así que se les puede dar la dosis antes de comer y la comida actuará como recompensa.

Precisión de la dosificación

El nivel de dosis y la duración del efecto de la misma no se pueden controlar siempre con precisión cuando, simplemente, se incluye el compuesto en la dieta diaria. La cantidad de sustancia consumida variará con la ingesta de agua y comida de cada animal. La ingesta de agua es particularmente variable y difícil de medir.

Existen problemas concretos con los hábitos alimenticios de ciertas especies. Los primates del Viejo Mundo guardan comida en las bolsas de sus bocas, a veces durante 30 minutos, por lo que es difícil decir cuando se la han tragado. El hámster almacena comida en los abazones (y en la cubeta) dificultando la precisión de la dieta. Las ratas comen durante varias horas, mientras que los perros consumen su comida muy rápidamente. Todo ello crea problemas para valorar la duración de la dosificación. Los animales coprofágicos presentan problemas particulares, p.e. al reciclar los materiales no absorbidos o sus metabolitos. (Esto constituirá siempre un problema cualquiera que sea la ruta elegida.)

En la mayoría de las especies la ingesta diaria por unidad de peso corporal se reduce con la edad.

- Intente presentarles pequeñas cantidades de comida a intervalos regulares para asegurar la exactitud de la dosis consumida. Utilice alimentos altamente palatables para garantizar que los animales se acostumbran a la nueva comida y la toman como un premio.
- Varíe la concentración en dieta/agua para conseguir asegurar una ingesta de “mg” o “ml/kg”. La dosis debe expresarse en términos del peso de la base (no de la sal) dada por unidad de peso corporal o de superficie corporal.
- Utilice comederos especiales que permitan medir con la mayor precisión posible la cantidad de dieta consumida, como los descritos para alimentar ratones, ratas, cobayas y hamsters (Poole 1987).

Se pueden producir contaminaciones cruzadas, a través de la dieta desperdiciada y/o el polvo, que pueden afectar a la precisión.

- Puede ser necesario separar los animales para alimentarlos; así como mantener un estricto control sobre la ventilación/flujo de aire.

Otros Problemas de bienestar

Quizás habría que estabular individualmente los animales para valorar la ingesta de la dieta con más precisión.

- Valore siempre si la necesidad de precisión en la medida de la ingesta es tan necesaria como para tener que alojar por separado a los animales, ya que puede resultar relativamente poco importante desde el punto de vista científico y sin embargo causar un estrés innecesario al privar a los animales de la interacción social. Valore lo que es necesario estandarizar para el tratamiento en grupo, frente a la conveniencia de proporcionar un entorno social/enriquecimiento ambiental.

A los animales se les manipula menos frecuentemente porque no hay necesidad de sujetarlos. Esto puede dificultar la actuación en otros procedimientos.

- Elimine los problemas resultantes de la falta de manipulación, solicitando el control diario del peso como parte del proceso o manipulándolos rutinariamente durante las labores diarias de trabajo.

3.10.2 Administración directa en la faringe Resumen del protocolo

Esta es una técnica que normalmente sólo se utiliza en gatos, perros, hurones, animales de

granja y aves aunque los conejos también pueden ser administrados de este modo (ver Tuffery 1995, Wolfensohn & Lloyd 1998). Se coloca una cantidad de sustancia, ya sea en suspensión, encapsulada o sólida, sobre la parte posterior de la lengua y se induce el reflejo de tragar masajeando la garganta. Los fluidos pueden ser instilados sobre la lengua o depositados en los abazones manteniendo la mandíbula y el morro inclinados hacia arriba. Para administrar una cápsula a un primate o a una rata, ponga la cápsula sobre el extremo de una sonda y "sople" para que salga. A las ratas hay que entrenarlas primero para que acepten la sonda.

Los neonatos se pueden dosificar permitiéndoles succionar el compuesto en forma de emulsión de un tubo de plástico PE50. A los ratones de 10 días, con un peso corporal de 4-6 g, se les pueden dar volúmenes de 40-50 µl. La técnica es más estresante que la dosificación oral en agua o comida porque es necesario inmovilizarlos.

Problemas potenciales y refinamientos

Se dan los mismos problemas citados más arriba en 3.10.1, y además:

Si la sustancia tiene un gusto desagradable, el animal puede desarrollar una respuesta condicionada y vomitar antes de ser administrado.

- Intente que las sustancias sean más palatables condimentándolas o encapsulándolas. Elija el tamaño de cápsula adecuado para la especie. Después de la dosis se les puede dar algún tipo de recompensa.

La dosis puede ser inexacta si las sustancias se derraman, son escupidas (inmediatamente o como una respuesta retrasada) o regurgitadas.

- La encapsulación elimina estos problemas pero tenga en cuenta que las cápsulas se pueden romper por sí solas, liberando el compuesto en una parte imprevista del intestino.

Durante la dosificación pueden ocurrir accidentes como que el animal se atragante.

- Evite que se atragante dándole los fluidos en pequeñas alícuotas (5 ml para perros, 250-500 µl para conejos), permitiéndole tragar entre cada alícuota.

Las dosificaciones repetidas pueden ser más estresantes para el animal y se incrementa la posibilidad de error.

- Limite entre 2 y 4 el número de dosis diarias. Esta manera se asemeja más a la forma

habitual de dosificar en clínica, resultando por tanto, un método más exacto y adecuado.

- Reduzca el estrés entrenando al animal a cooperar en el procedimiento.

3.10.3. Sonda oral

Resumen del protocolo

La técnica ha sido descrita con detalle en numerosas publicaciones, para las especies más habituales de animales de laboratorio (Paget & Thomson 1979, Poole 1987, Waynforth & Flecknell 1992, Tuffery 1995). En resumen, un tubo de alimentación unido a una jeringa o impulsor, se pasa a través del esófago hasta el estómago y la sustancia a dosificar se expulsa suavemente a una velocidad regular controlada, suficientemente lenta para evitar la regurgitación.

Problemas potenciales y refinamiento

Este es el método más estresante y técnicamente más difícil de administración oral, aunque un técnico experimentado y habilidoso puede hacer que parezca engañosamente fácil.

La sustancia

La sustancia puede ser irritante. Los efectos pueden ser aparentes, p.e. respiración dificultosa si quedan gotitas al final de la sonda y entran en los pulmones, o no aparentes, p.e. ulceración del estómago.

- No administre sustancias que puedan causar irritación gástrica.
- Evite el contacto directo del tubo con el esófago o la pared del estómago asegurando la correcta longitud del tubo de la sonda.
- Evite la formación de gotitas que pudieran ser inhaladas provocando reacciones graves. Es importante estar seguros de que no hay gotas en el extremo del tubo cuando se le introduce hacia el esófago. Seque o limpie el tubo con un papel y lave el tubo con una pequeña cantidad de agua después de la administración para evitar que inadvertidamente caigan gotas irritantes cuando se retire el tubo.

Los compuestos pueden producir espumas y bloquear la tráquea o provocar una neumonía por cuerpo extraño, si se administra en los pulmones por error.

- Tenga especial cuidado para asegurar que la sonda está en el estómago. Considere detenidamente cuáles son los volúmenes máximos a administrar para compuestos que puede producir espuma.

La técnica

Si se coloca el tubo incorrectamente, se presiona indebidamente, o si el animal se mueve, el tubo puede penetrar en la tráquea o atravesar las paredes del esófago o estómago hacia la cavidad torácica o peritoneal. Pueden producirse abscesos subcutáneos como resultado de infecciones procedentes del mediastino, p.e. inflamación en la región axilar. La inserción repetida del tubo para dosificaciones frecuentes puede producir inflamación y ulceración del esófago.

Cuando se utiliza un tubo rígido unido a una jeringa y el tubo se introduce inadvertidamente en los pulmones en lugar de en el esófago o estómago, la presión negativa puede provocar la aspiración de aire hacia el interior de la jeringa, en lugar de vaciarla.

- Mantenga al animal quieto y busque el mejor ángulo de la cabeza y el cuerpo para facilitar la administración. Esta situación es muy importante y requiere una inmovilización correcta y cuidadosa.
- Familiarícese con la estructura anatómica de la orofaringe y desarrolle el grado necesario de habilidad antes de comenzar a dosificar, a fin de garantizar la correcta colocación de la sonda.
- Utilice siempre el tamaño correcto (longitud y diámetro) de tubo de alimentación para garantizar que la dosis entra en el estómago y no se queda en el esófago. Por ejemplo, en perros la longitud correcta se corresponde con la distancia desde la nariz vía el acromion de la espalda hasta la décima unión costocondral; la correcta colocación se confirma por el olor del contenido gástrico. En ratones el tubo debe extenderse desde la punta de la nariz hasta la última costilla. Marque la longitud previamente. Haga las correcciones necesarias en animales pequeños o jóvenes.
- Observe si aparecen condensaciones visibles que avisan de que el tubo ha sido introducido inadvertidamente en la tráquea.
- Utilice tubos con un pequeño fiador blando en el extremo para evitar la penetración de la pared gástrica. Los catéteres flexibles son preferibles a los tubos rígidos; se pueden utilizar de plástico en lugar de metálicos (pero considere las posibles reacciones entre los compuestos y el tubo).
- Considere la posibilidad de lubricar los tubos con vaselina o parafina médica para facilitar el paso.
- Si nota cualquier resistencia durante la inserción de la aguja, o si hubiera algún signo

de ahogamiento o malestar, retire el tubo y reemprenda el procedimiento.

- Vigile siempre al animal durante un rato después de devolverlo a su jaula, buscando cualquier reacción adversa al procedimiento y observe si se producen regurgitaciones o vómitos. Si los animales murieran después de la dosificación oral, realice una necropsia para averiguar la causa de la muerte y descartar que la mala ejecución de la técnica haya sido el factor desencadenante.
- Si sospecha que ha administrado en los pulmones, mantenga el pecho del animal próximo a su oído y escuche si se producen “gorjeos” o “carraspeos”. Si la toma ha ido a los pulmones, sacrifique el animal para prevenir posteriores sufrimientos.

Las mordazas pueden producir malestar.

- Utilice mordazas solamente si con esto la técnica resulta más fácil de realizar y menos estresante para el animal. Asegúrese que las mordazas tienen un diseño cómodo para el animal. Si se estrecha uno de los extremos se facilita su introducción en la boca.

Los animales pueden regurgitar la toma o vomitar. Este es un problema que se suele dar en hurones.

- Introduzca siempre el contenido de la sonda a un ritmo controlado y retire el tubo cuidadosamente. Vigile al animal con atención una vez devuelto a la jaula.

Deprivación de comida

Con frecuencia la comida se retira durante la noche, durante unas 18 horas, para vaciar el estómago del animal antes de la administración. Esto es mucho tiempo, especialmente para ratas y otros animales cuyo comportamiento suele ser el de comer “poco pero con frecuencia” y cuyo período de alimentación es por la noche.

- Piense detenidamente las razones para retirar la comida ya que pocas veces está justificado –un estudio reciente realizado por Vermeulen *et al.* (1997) demostró que el estómago de ratas machos estaba vacío después de 6 h sin comida- y requiere una buena razón científica (es decir, si la absorción de los compuestos varía dependiendo de si el animal está alimentado o en ayunas). Aunque se retire la comida, siempre deben tener agua. Siempre que se les retire la comida debe solicitarse autorización a la autoridad competente o al

comité ético junto con instrucciones precisas sobre el momento de volver a alimentarlos.

Animales jóvenes

Con los animales jóvenes se debe tener un cuidado extremo. Existen consideraciones especiales con respecto a su tamaño, molestia a la camada y periodo de administración después de la ingestión de leche. La administración a animales no destetados es difícil y debe evitarse si es posible. Debe evitarse sondear a ratas de menos de 6 días.

Primates

Con los primates del Viejo Mundo, la utilización de sonda oral debe solamente considerarse en casos en que sea esencial asegurar que toda la dosis de una droga llega al estómago al mismo tiempo. Es un procedimiento sencillo siempre que el personal tenga gran experiencia en realizarlo. El estrés de la técnica se suma al de la necesaria inmovilización, para la que el personal también debe estar bien entrenado y ser competente. La lubricación del tubo facilitará el paso.

Si fuera posible, debe evitarse la sonda oral y administrar las sustancia oralmente por otro medio.

3.11 Minibombas osmóticas

Utilización de la técnica

Las minibombas osmóticas pueden utilizarse para permitir la liberación continua de droga durante largos periodos (Theeuwes & Yum 1976, Nau 1985, Collins 1987) y para evitar el estrés de la dosificación repetida.

Resumen del protocolo

Comercialmente existen bombas diseñadas para ir liberando durante diferentes periodos de dosificación. Puede lograrse un flujo constante del material de ensayo de hasta 2 semanas. Las minibombas se utiliza normalmente en rata, ratón, cobaya, hámster y conejo, aunque pueden ser implantadas ocasionalmente en todas las especies. En ratones, las minibombas son relativamente grandes para el tamaño corporal del animal, pero son bien toleradas, siempre que se coloquen en una posición que no les dificulte el movimiento. El dispositivo se inserta subcutáneamente o, en ocasiones, intraperitonealmente, mediante un procedimiento quirúrgico sencillo. Hay que utilizar asepsia y analgesia.

La analgesia debe administrarse tan pronto como el animal esté anestesiado, para que su

efecto se produzca en el momento en que el animal recupera la consciencia. Debe eliminarse con suavidad el pelo de la zona dorsal con una esquiladora eléctrica fina y limpiarse la piel con una preparado dérmico antiséptico. Se hace una incisión, como de 1 cm de longitud, en la piel del dorso del animal, a medio camino entre la cabeza y la base de la cola. La bomba debe colocarse a lo largo del eje del cuerpo y a un lado de la columna vertebral. La incisión debe hacerse 1-2 cm por detrás del punto donde se prevé que estará el polo caudal de la minibomba cuando quede instalada. A través de esta incisión, se introducen bajo la piel unas pinzas hemostáticas en dirección craneal. Abriendo las hojas de las pinzas hemostáticas se forma un bolsillo subcutáneo donde se ubicará la minibomba. Ésta debe introducirse en el bolsillo con el extremo dispensador mirando hacia delante. La herida de la piel se cierra con grapas (no de níquel) o suturas. Deben proporcionarse los convenientes cuidados y vigilancia peri-operatoria.

Algunos protocolos pueden requerir la retirada o el reemplazamiento de la minibomba después de un periodo especificado. En este caso, también debe trabajarse bajo anestesia general utilizando técnicas asépticas y analgesia. Se abre la incisión original, se retira la bomba con unas pinzas y se sutura la herida.

Algunos fabricantes/distribuidores de minibombas (ALZA Corporation 1990) proporcionan un vídeo que muestra la técnica básica para la implantación subcutánea y otras aplicaciones, tales como la implantación intraperitoneal y la conexión a catéteres para la infusión intravenosa. Proporcionan información práctica sobre cirugía, pero no sobre temas de bienestar animal.

Es posible suministrar a un centro el material a dosificar y después adquirir los animales ya implantados. Sin embargo, tenga en cuenta que el transporte de animales quirúrgicamente preparados o animales dosificados, también tiene implicaciones sobre el bienestar.

Problemas potenciales y refinamiento

El método puede tener significativos beneficios para el bienestar del animal sobre la dosificación repetida por otras vías donde se requiera la inmovilización, la infusión o la inyección, pero también debe valorarse frente al estrés de la cirugía. Los efectos adversos más probables de la técnica son los que se deben a la toxicidad de los compuestos o las drogas contenidas en la minibomba.

Se puede observar una reacción hacia la minibomba si la superficie está excoriada. A veces también puede producirse pérdida de peso.

- Maneje las bombas con cuidado. Cuando controle el peso corporal en animales pequeños tenga en cuenta el peso de la minibomba y el compuesto. Cualquier pérdida de peso no debe exceder de la observada después de la anestesia.

La técnica necesita anestesia y cirugía, ambos de los cuales son procedimientos potencialmente traumáticos. La mayoría de las heridas cierran bien, pero a veces puede ocasionalmente producirse la apertura de la misma.

- Esta técnica debe llevarse a cabo solamente por personal experimentado y competente. Es esencial un conocimiento sobre la anestesia, la técnica quirúrgica aséptica y los cuidados perioperativos, incluyendo la analgesia postoperatoria.
- Vigile los animales detenidamente después de la implantación. Puede ser necesario alojar los animales por separado durante 24 horas para que la piel cierre adecuadamente.

Sólo pueden administrarse pequeños volúmenes, por lo tanto la formulación a menudo tiene que estar muy concentrada, por lo que puede precipitar al contacto con los fluidos corporales y la bomba puede llegar a bloquearse como consecuencia de ello.

Compruebe (*in vitro*) que no se producen precipitaciones.

3.12 Vías respiratorias

Utilización de la técnica

La vía respiratoria se usa frecuentemente en toxicología y se selecciona cuando es la ruta de exposición humana a las sustancias de ensayo. También se utiliza para administrar ciertas vacunas y medicamentos, especialmente cuando se requieren los efectos sobre el tracto respiratorio o cuando se necesita una rápida absorción sistémica. La gama de técnicas de exposición experimental refleja la variación de la exposición humana. Ésta puede variar desde unos pocos segundos (algunas vacunas y medicamentos) a prácticamente exposición continua, 24 h al día, 7 días a la semana (para contaminantes ambientales aerotransportados). La exposición puede ser:

- (i) Todo el cuerpo
- (ii) Solo la nariz
- (iii) Máscara

Los potenciales efectos adversos de las sustancias sobre el tracto respiratorio son comunes a todas ellas y factores tales como el pH o la irritación debe ser considerados en cada caso (ver Sección 2.3). Se aconseja la realización de estudios pilotos para valorar y evitar los potenciales efectos adversos. La administración de sustancias por inhalación ha sido descrita detalladamente por Phalen (1984), (ver también Kennedy *et al.* 1989, Waynforth & Flecknell 1992).

3.12.1 Exposición de toda la superficie corporal Resumen del protocolo

Los animales se exponen a la sustancia, bien en cámaras de inhalación especialmente diseñadas, o bien en jaulas con dimensiones similares a las de estabulación normal cuando la exposición se realiza durante muchas horas al día (es decir, exposición casi continua). Las jaulas pueden ser de malla (para asegurar la circulación del aire) y pueden tener algunas otras pequeñas modificaciones.

Problemas potenciales y refinamiento

Siempre que se utilicen cubetas estándar, no debiera existir ninguna o casi ninguna incomodidad derivada de la técnica, diferente a la que tenga el resto de animales mantenidos en las habitaciones. Sin embargo, cualquier restricción sobre el espacio disponible, la comida o el agua o sobre la naturaleza del medioambiente físico o social, como puede ser el ruido de la ventilación o el equipo de administración, puede provocar malestar.

La monitorización continua de los animales en las cámaras de inhalación, puede no resultar una tarea fácil.

- Utilice cubetas de policarbonato transparente para facilitar la observación de los animales y/o sitúe bien las cubetas con respecto de las luces y las ventanas. Vigile estrechamente el comportamiento de los animales por si manifestaran signos de ansiedad, por ejemplo utilizando equipos de vídeo.

Algunos diseños de cámaras de inhalación no tienen bandejas para la cama a fin de no impedir la circulación del aire. En este caso, a las ratas que se encuentran en los niveles más bajos les pueden caer las heces y la orina de las ratas estabuladas en las cámaras más altas.

- Este diseño de cubeta es inaceptable y no debe utilizarse.

Las cámaras de inhalación están más diseñadas pensando en el procedimiento que en el confort de los animales. En ellas el espacio de la base suele reducirse con lo que se restringe la posibilidad de enriquecimiento ambiental.

- Busque formas de mejorar el confort de las cubetas y enriquecer el ambiente. Devuelva a los animales a las cubetas convencionales entre las exposiciones.

Cuando las exposiciones duran varias horas al día (1-6 h), normalmente se les retira la comida.

- Dependiendo de las especies, a ser posible, no retire la comida y especialmente el agua más de 6 u 8 horas al día, sobre todo si la exposición va a durar varios días. Debe disponerse siempre de agua.

Para la generación de ambientes de ensayo generalmente se usa aire limpio, filtrado y seco. A largo plazo, esto puede producir en la cámara de inhalación, un nivel de humedad relativa demasiado bajo, con el riesgo de aparición de la cola anillada (*ringtail*) en roedores jóvenes.

- Asegúrese de que la humedad está controlada adecuadamente (>40%) y que el suministro de aire no falla.

Una vez ha terminado la exposición, a veces, los animales se lavan y secan, o se limpian para eliminar los materiales ensayados depositados sobre su piel, con lo que se aumenta su estrés.

- Determine si este material de ensayo que se deposita sobre la piel constituye realmente un problema en términos de exposición y no lave al animal si no es necesario. Si hay que limpiar a los animales, seleccione cuidadosamente el agente de limpieza para que no tenga efectos adversos.

El producto puede contaminar la comida y el agua de bebida.

- Diseñe los comederos y biberones para que la contaminación sea mínima y cuantifique el contenido del material de ensayo en la comida/bebida. No es necesario la exposición de los animales en presencia de comida/bebida si ésta es sólo durante un corto espacio de tiempo.

Los aparatos utilizados para generar la atmósfera de ensayo pueden ser ruidosos dentro del rango de sonido audible o del de ultrasonidos.

- Esté atento a esta posibilidad cuando valore el comportamiento de los animales. Mida tanto

los ultrasonidos como las frecuencias normales y no use equipos ruidosos más de una vez cada 24 h. Habitúe a los animales a la cámara para evitar el estrés del nuevo ambiente.

3.12.2 Sólo exposición nasal / Sólo exposición del hocico

Utilización de la técnica

Esta técnica es un método más preciso de administración que la de exposición de todo el cuerpo. Normalmente sólo se utiliza con rata, ratón y hámster.

Resumen del protocolo

Los animales se colocan en tubos cónicos transparentes de policarbonato de forma que el hocico asome fuera de un agujero en la extremidad del cono. Los tubos tienen una gama de tamaños para ajustarse al del roedor que se va a exponer. Los tubos de tipo Batelle incluyen un tope posterior con un agujero a través del cual pasa la cola del roedor. Así se evita que el animal pueda salirse por detrás del tubo. Unos respiraderos a los lados del tubo permiten que el animal permanezca fresco y reducen la acumulación de vapor de agua.

Problemas potenciales y refinamiento

Esta técnica es inevitablemente estresante debido a la inmovilización en el tubo. Puede producir la muerte y de hecho se producirá, si no se realiza adecuadamente.

Los tubos que no son del tamaño y forma adecuada para el animal pueden permitir que el animal se gire parcialmente, lo que le producirá angustia pudiendo morir o hacer que la exposición a la inhalación no sea la correcta.

- La forma de los tubos es obviamente crucial, por lo tanto no se debe intentar la fabricación de dispositivos "caseros" sin una exhaustiva comprobación de los requerimientos y la realización de pruebas preliminares sin animales.
- Asegúrese de que la adaptación del animal al cono es tal que no se pueda girar. Hay que vigilar continuamente a los animales mientras están en los tubos para identificar y ayudar a cualquiera que esté angustiado.

La introducción de una rata o ratón en un tubo puede parecer simple y que requiere poco entrenamiento, sin embargo una mala técnica puede provocar un estrés innecesario e incluso la muerte de los animales.

- Asegúrese que todo el personal está entrenado y es competente para realizar el procedimiento.

En algunos estudios toxicológicos los animales pueden ser inmovilizados durante largos periodos, cada día, durante muchos meses.

- Habitúe a los animales a los tubos para minimizar el estrés. El periodo de inmovilización debe irse aumentando durante varios días antes que empiece la exposición a la sustancia de ensayo, sin embargo, aunque los animales se acostumbren a los tubos, el primer día de la administración real puede ser muy estresante.
- Mantenga a los animales en los tubos solamente el tiempo mínimo consecuente con los requerimientos científicos, pero no debe exceder las 4 horas. Reduzca el tiempo en el tubo teniendo la precaución de sacar primero a aquellos animales que también se introdujeron primero. Procure tener más de una persona preparada para introducir y sacar los animales, reduciendo así el tiempo total de inmovilización.

Durante el periodo de exposición, las heces y la orina se acumulan en los tubos.

- En exposiciones a largo plazo vigile y retire las heces y la orina. Compruebe que los tubos se lavan adecuadamente después de cada uso.

3.12.3 Exposición mediante máscara

Utilización de la técnica

Las máscaras se utilizan frecuentemente para la exposición de perros y primates a la inhalación. En general, la técnica es equivalente (aunque no totalmente) a la de exposición nasal de roedores.

Resumen del protocolo

La exposición puede hacerse una o varias veces al día (hasta 5 exposiciones al día) y puede ser por unos segundos cada vez o hasta a una hora al día en una única sesión, durante varias semanas o meses.

Se debe inmovilizar los animales y si la exposición es breve (segundos o unos minutos), es mejor hacerlo manualmente. Los perros necesitan dos personas, una para sujetar y otra para administrar, aunque si se entrena a los animales, con un sólo técnico puede ser suficiente. Los grandes primates necesitan tres personas. Para exposiciones más largas, los perros pueden o bien ser inmovilizados sobre el

regazo de un técnico de animalario o descansando en una especie de hamaca o arnés con aberturas para las patas mientras llevan la máscara. Los primates pueden ser inmovilizados en sillas. Los animales en tales hamacas o sillas no deben estar NUNCA desatendidos, aunque una persona puede estar supervisando al mismo tiempo varios animales adecuadamente adiestrados.

Las máscaras generalmente tienen una manga de goma que proporciona un ajuste hermético alrededor de la boca y las fosas nasales. A través de la manga, se introduce un tubo en la boca y se posiciona sobre la lengua. Puede comprobarse su correcta colocación mirando por debajo del mismo. El resto del equipo incluye; una válvula de inhalación de una vía; un sensor de presión que al detectar una inspiración activa un grupo de presión formado por un impulsor dosificador de aire a presión y una válvula de espiración. La naturaleza exacta de la dosis, el suministro de aire y el equipo de ventilación variará con el material del ensayo (líquido, sólido o gaseoso) el respirador, la exactitud de la dosis y la necesidad de exponer la cavidad nasal.

Nota: Para una dosificación mediante exposición a corto plazo con inhaladores de dosificación graduada (MDI) se puede utilizar un tubo orofaríngeo en lugar de una máscara. Éste se apoya sobre la parte superior de la laringe permitiendo que se monitorice la respiración.

Problemas potenciales y refinamientos

La inmovilización requerida puede hacer la técnica potencialmente muy estresante, especialmente cuando es por largos periodos.

Usar una máscara puede ser desagradable para el animal, puede provocarle malestar y/o puede tener fugas.

- Compruebe que el diseño de las máscaras es cómodo y aceptable. Revíselas regularmente para asegurarse de que se ajustan a cada individuo de forma cómoda y segura. Cuando se utilicen tubos orofaríngeos, tenga en cuenta que los perros más pequeños necesitaran tubos más cortos y estrechos.
- Adiestre a los animales para que acepten la inmovilización y después la máscara, antes de comenzar el estudio. Esto puede llevar hasta 3 semanas y se les debe dar el tiempo suficiente para ello. Los individuos que no se adapten (es decir, que muestren ansiedad) no se deben utilizar en el estudio.

Materiales de ensayo, como polvos secos, puede provocar que se resequen las superficies de las mucosas produciendo malestar a los animales. En primates puede dar lugar a contención de la respiración y desvanecimiento.

- Inspeccione la cavidad oral de los animales antes de cada exposición y reduzca la dosis y el periodo de exposición a la inhalación. Formule en solución acuosa si fuera posible.

Los aparatos mecánicos pueden fallar.

- Compruebe los aparatos regularmente. Asegúrese siempre de que el animal podrá respirar en caso de que el equipo falle.

3.13. Subcutánea

Utilización de la técnica

La inyección subcutánea se utiliza habitualmente para la administración parenteral de muchas sustancias. La vía proporciona una lenta liberación, evitando el metabolismo de primer paso por el hígado y se puede utilizar para imitar la vía de administración de un medicamento.

Resumen del protocolo

El lugar de elección en roedores y conejos para una inyección única es normalmente en la región escapular. En perros y gatos el lugar de preferencia es detrás del cuello u ocasionalmente en la fosa sublumbar del costado o detrás del cuello. En primates la inyección se hace bajo un pliegue de piel en el lomo del animal. En aves, la inyección subcutánea se puede administrar en la cara medial del muslo donde normalmente hay amplio espacio y donde la posición de la aguja se puede ver claramente si se humedecen las plumas con alcohol. No suele ser necesario arrancar las plumas (Hawkins *et al.* 2001). Para una descripción de la técnica, ver Waynforth y Flecknell (1992), Tuffery (1995) y Wolfensohn y Lloyd (1998).

Efectos potenciales y refinamiento

Esta técnica es muy dolorosa si el pH o la osmolaridad son incorrectos, o si el material es irritante o citotóxico. Puede producir necrosis del tejido. Si la osmolaridad es incorrecta pueden difundir fluidos del tejido hacia el punto de inoculación.

- Cuando se desconoce el efecto de la sustancia de ensayo, es esencial realizar un buen estudio preliminar. Es necesario solucionar completamente las reacciones adversas antes de repetir la administración.

- Elija el lugar cuidadosamente. Si pudieran producirse efectos adversos, recorte el pelo de alrededor, para permitir la pronta detección de problemas, de manera que sea más fácil resolverlos.
- Compruebe que la solución es estéril y que el pH y la osmolaridad son correctos. Las reacciones a los adyuvantes, especialmente al adyuvante completo de Freund, pueden tener un efecto compuesto en la inyección. Por ejemplo en los conejos, una reacción de este tipo en la piel del flanco, actúa sobre los músculos respiratorios pudiendo hacer la respiración dolorosa.
- Considere meticulosamente la naturaleza del adyuvante y el protocolo de acuerdo con documentos bibliográficos como los de Jackson y Fox (1995), Animal Welfare Information Center (1997) y Palmer *et al.* (1997). Para recomendaciones detalladas, ver Sección 2.3.

La utilización de antisépticos de la piel para “esterilizarla” puede producir lesiones innecesarias o perjudicar a los organismos comensales de la piel.

- Normalmente no es necesario limpiar la zona, excepto quizás en el caso de animales de granja. Compruebe que las sustancias para la inyección están estériles (y templadas) y utilice una aguja nueva para cada animal.

La inserción incorrecta o imprecisa de la aguja puede herir al animal, pinchar un vaso sanguíneo o depositar la sustancia incorrectamente. Si el animal se mueve, se puede producir una inyección intramuscular no deseada o se puede pinchar un vaso sanguíneo. Es un particular problema con perros.

- Mantenga al animal muy quieto. Introduzca la punta de la aguja en el espacio subcutáneo con un movimiento rápido pero firme. Dirija la aguja hacia el lado del cuello con el bisel hacia arriba. Tire del émbolo hacia atrás para estar seguro que la aguja no ha entrado en un vaso sanguíneo.

El volumen de fluido que se puede introducir varía con el tamaño del animal, la zona, la laxitud de la piel y la naturaleza físico-química de la sustancia.

- Elija una zona donde la piel sea más laxa y móvil para depositar el volumen (ver Tabla 4). Para la administración de volúmenes mayores se puede considerar la posibilidad de inyectar en múltiples lugares, aunque si la administración es diaria, no debe hacerse en más de cuatro puntos.

Cuando se realizan estudios con dosis repetidas, la sustancia puede depositarse en un único lugar.

- Utilice volúmenes de dosis más pequeños en ensayos con dosis repetidas, que cuando el ensayo sea con una única dosis. Masajea la piel que se encuentra sobre el lugar de inyección para dispersar los fluidos.
- Cambie de lugar en los estudios con dosis repetidas.

3.14 Tópica-dérmica

Utilización de la técnica

La vía dérmica se utiliza para investigar los efectos, tanto locales como sistémicos, que siguen a la absorción y metabolismo dérmico. Puede ser utilizada para ensayar agentes potencialmente terapéuticos para enfermedades de la piel, o para comprobar el riesgo de que se produzca irritación de la piel o sensibilización/alergia.

Resumen del protocolo

Casi sin excepción, las actuales líneas directrices reguladoras en toxicología, proponen la realización de pruebas de toxicidad dérmica sólo sobre piel intacta.

Las especies más habitualmente utilizadas son conejos, ratas, ratones y cobayas. Se requiere la adecuada inmovilización de los animales conscientes. Los líquidos pueden aplicarse diluidos o sin diluir. Los productos sólidos deben ser reducidos a polvo y humedecidos hasta formar una pasta mediante solución salina o un disolvente apropiado que no “desengrase” la piel. Las zonas de aplicación pueden cubrirse o no, o cubrirse parcialmente dependiendo del patrón de exposición más probable.

Cubrir total o parcialmente, permite utilizar mayores volúmenes de dosis y en general, también incrementa la absorción. Al final del periodo de exposición se retira el vendaje con cuidado y normalmente se lava la zona con agua caliente y se seca suavemente.

Si no se cubre la zona, también puede impedirse que los animales ingieran la sustancia situando el punto de aplicación próximo a la cabeza o colocándoles un collar isabelino.

Problemas potenciales y los refinamientos

Las sustancias irritantes pueden producir serios efectos perjudiciales.

- Es esencial comenzar a realizar el ensayo de una forma prudente (Home Office 1994). En

primer lugar, compruebe las propiedades físico-químicas por si fueran potencialmente irritantes, si se puede haga una valoración posterior en cultivos celulares y después haga una prueba previa en un sólo animal.

- En general, no coloque sustancias irritantes sobre la piel, a menos que la prueba consista en comprobar el potencial de irritación. En tal caso, supervise al animal con especial cuidado y retírelo del estudio si presenta síntomas de malestar.
- Se puede cuantificar el eritema y decidir el momento de punto final mediante una inyección intravenosa de azul de metileno.
- Aplique uniformemente la sustancia de ensayo, cubriendo como máximo el 10% de la superficie corporal (p.e. 5 cm x 5 cm para ratas, 12 cm x 14 cm para conejos y 7 x 10 cm para cobayas). El área de aplicación para sustancias altamente tóxicas debe ser mucho menor. Evite las zonas de los ojos y genitales.

Cuando se recorta o afeita el pelo se pueden producir abrasiones involuntarias de la piel, lo que puede incrementar la posible irritación para el animal e introducir errores experimentales al aumentar la tasa de absorción. El aceite o la grasa de la esquiladora puede modificar la respuesta de la sustancia ensayada.

- Utilice únicamente animales con la piel limpia, intacta y desengrasada. Tenga mucho cuidado cuando esquile o afeite el animal y asegúrese que las esquiladoras están limpias. Prepare la zona 24 h antes para dar tiempo al animal a recuperarse.

En algunas pruebas se abrasiona la piel deliberadamente antes de aplicar la sustancia.

- Reconsidere siempre la necesidad de realizar estos procedimientos más agresivos y comuníquelo a las autoridades reguladoras que lo soliciten. Si no existen alternativas, compruebe si con la fijación y retirada de cinta adhesiva se proporciona la suficiente abrasión (pero tenga en cuenta que esto también puede producir malestar). En cualquier caso suele ser suficiente desprender la epidermis, p.e. mediante un ligero rascado con una aguja sin que llegue a producir que sangre.

Los volúmenes mayores de unos 500 µl tienden a derramarse por el lomo de los animales más pequeños, desbaratando el objeto del experimento.

- La dosis máxima de un material de ensayo exigida por las autoridades reguladoras para estudios toxicológicos es de 2 g/kg. Adminístrelo en volúmenes menores de 500 µl.

Los apósitos pueden afectar la movilidad. Si se ajustan fuertemente pueden provocar una excesiva presión abdominal, lo que puede dar lugar a lesiones internas no apreciables.

- Asegúrese que los apósitos no están demasiado fuertes y no restringen el movimiento del animal o le provocan excesiva presión abdominal. El tiempo máximo de tapado debe ser de 24 h. *Nota:* La prueba estándar de Magnusson y Kligman requiere 48 h de tapado (Organization and Development 1992).

La retirada de los apósitos adhesivos puede arrancar el pelo o la piel del animal produciendo dolor.

- No aplique materiales muy adhesivos al pelo o la piel si tienen que ser retirados antes de que el animal muera.
- Determine el método menos doloroso para retirar los apósitos practicando sobre usted mismo antes de aplicarlo al animal. Considere si pudiera ser beneficioso aplicar anestesia o sedación.

El uso de collares en ratas parece ser especialmente estresante.

- Evite el uso de collares para ratas aplicando la sustancia en un área pequeña de piel cercana a la cabeza.
- Todos los animales tienen que ser adiestrados para que acepten el collar.

3.15 Tópica – ocular

Utilización de la técnica

El producto se aplica en los ojos para valorar los potenciales efectos irritantes. También se utiliza la aplicación a las membranas de la mucosa conjuntival y al epitelio de la córnea para conseguir altas concentraciones de drogas para terapia ocular. El conejo se utiliza universalmente para estudios de irritación ocular, incluso aunque existen deficiencias y excepciones en la predictibilidad de resultados. Los perros y primates se usan a veces para investigación de productos farmacéuticos de tratamiento a largo plazo en oftalmología.

Resumen del protocolo

El Ministerio del Interior del Reino Unido (Home Office 1994) ha elaborado unas directrices muy útiles sobre la realización de estudios de irritación ocular que en el Reino Unido son de cumplimiento obligatorio. Los principios son universalmente aplicables.

Las sustancias pueden aplicarse a los ojos por dos métodos: aplicación directa en el saco conjuntival o directamente en la córnea. El método de exposición conjuntival ha sido adoptado habitualmente debido a su facilidad de aplicación. Sin embargo, la idea actual es que la exposición conjuntival es inapropiada bajo muchas circunstancias, especialmente cuando el material de ensayo es polvo que puede quedar atrapado en el saco conjuntival produciendo un daño mecánico al ojo. El método de exposición en la córnea se asemeja más a la exposición humana accidental, como ocurre por ejemplo en los accidentes con productos químicos. Cuando hay alguna posibilidad de irritación u otro daño se debe seguir un sistema de aproximación gradual por etapas (Home Office 1994). No proceda a utilizar animales hasta que se haya realizado la caracterización físico-química inicial, la citotoxicidad in vitro u otros estudios y los ensayos de tolerancia dérmica. Siempre debe realizarse un estudio inicial en un animal, utilizando solamente un ojo.

Se han desarrollado varias aplicaciones para la exposición de la córnea, pero para propósitos rutinarios se retrae suavemente los párpados y se aplica la formulación de ensayo directamente en la córnea. El ojo tratado puede irrigarse con agua 20-30 s, después de la aplicación de la sustancia de ensayo. Hay que observar muy estrechamente a los animales dejándolos al menos 24 h, para ver si se observan daños aparentes.

Problemas potenciales y refinamiento

Esta prueba puede llegar a producir gran ansiedad en los animales. Nunca se deben realizar ensayos en los ojos con sustancias que sean muy irritantes para la piel. Hay que vigilar estrechamente a los animales por si aparecieran efectos adversos a lo largo del procedimiento. Si se produce una reacción adversa grave, hay que sacrificar al animal y no se deben utilizar más animales.

Las sustancias pueden producir opacidad, seria irritación, dolor, inflamación o ulceración. Hay que considerar principalmente los efectos sobre la

córnea, conjuntiva e iris, aunque si el material a aplicar puede penetrar más profundamente en el ojo también pueden verse afectadas otras estructuras.

- No aplique en los ojos sustancias que se sepan corrosivas como las que tienen un alto potencial de oxidación, detergentes, o irritantes conocidos (Home Office 1994). Compruebe siempre las propiedades físico-químicas en busca de pruebas de irritabilidad. Los límites de pH son entre 2-11,5 pero lo mejor es un pH neutro (ver Sección 2.3).
- La primera vez que se administra la sustancia se pueden anestesiar los ojos mediante la aplicación de un anestésico tópico, de forma que si aparece cualquier irritación inesperada, el animal no lo sentirá (Seabaugh *et al.* 1993). Si el anestésico es incompatible con el compuesto o existen en general dudas, utilice un anestésico general para el primer ensayo.
- Infórmese sobre cuáles son las probables respuestas y sea capaz de reconocer y responder rápida y adecuadamente a los efectos adversos, como se establece en las directrices de 1994 del Ministerio del Interior Británico (Home Office).

Las sustancias insolubles y duras pueden producir daños mecánicos cuando se aplican sobre la conjuntiva.

- No ponga sustancias insolubles, ásperas o duras, sobre los ojos de los animales. Los cristales deben estar micronizados.

El lavado puede afectar el resultado del ensayo y si no se ha tenido en cuenta en el protocolo experimental, el ensayo puede tener que repetirse utilizando más animales.

- El efecto del lavado sobre el ensayo (en oposición al efecto sobre el animal) depende del producto químico, de la concentración, el tiempo transcurrido entre la exposición y el lavado y del volumen del lavado. Sopesa siempre estos factores frente a los requerimientos legales para el ensayo, antes de realizar el procedimiento.

Según la opinión de algunos científicos, los volúmenes que excedan de los 50 μl pueden ser exagerados y pueden simplemente derramarse del ojo.

- Las consideraciones anatómicas y fisiológicas sugieren que el volumen máximo practicable que puede instilarse en el saco conjuntival del

conejo es de 30-50 μl (*Nota:* en las líneas directrices de la OCDE se requieren 100 μl) por lo tanto, ponga en duda requerimientos de volúmenes mayores. Puede considerarse la realización de un ensayo en ojos utilizando un volumen de solamente 10 μl .

Los animales dosificados y después mantenidos inmovilizados para valorar la recuperación pueden sufrir angustia permanente.

- La necesidad de valoración de la recuperación debe ponerse en duda siempre y establecerla de acuerdo con las autoridades reguladoras. Vigile los animales muy estrechamente y considere si se les deben aplicar analgésicos sistémicos (Fielder *et al.* 1987).

3.16 Almohadilla plantar

Esta vía tiene un alto índice de molestia (Barclay *et al.* 1988) y se recomienda muy encarecidamente que no se utilice a menos que se demuestre que es la *única* efectiva para lograr un objetivo específico.

Las almohadillas plantares se utilizaron como lugar de inoculación para la producción de anticuerpos, ensayos de nódulos linfáticos poplíteos, artritis por adyuvantes, valoración de agentes analgésicos e investigación de mecanismos del dolor e inflamación y para investigación micobacteriana, pero para prácticamente todas esas aplicaciones, existen actualmente vías alternativas satisfactorias (Bennett *et al.* 1992, Leenars *et al.* 1997). Por ejemplo, para la producción de anticuerpos, casi siempre se pueden conseguir títulos adecuados utilizando otros lugares por vía subcutánea y seleccionando cuidadosamente los adyuvantes, por lo que se considera innecesario utilizar la almohadilla plantar para este propósito. Para pruebas con los nódulos linfáticos poplíteos, la mayoría de los investigadores considera ahora que la inoculación en cualquier tejido que drene en los nódulos linfáticos dará buenos resultados. Se han desarrollado ensayos alternativos para sensibilización de piel, tales como pincelar la piel, ensayo de nódulo linfático local y la prueba de inflamación de la oreja de ratón. Para inducir artritis por adyuvante, ahora se consideran bastante efectivas las vías intradérmica y subcutánea, como para poder reemplazar a la almohadilla.

Es difícil encontrar un modo práctico de evitar la vía de la almohadilla plantar en inyecciones para valoración de agentes analgésicos e investigación

de mecanismos de dolor e inflamación. Tales experimentos son a corto plazo y puede implicar la inyección de agentes hiperalgésicos o inflamatorios (tal como prostaglandinas o carragenina) en la almohadilla lo que produce una reacción inflamatoria, o algo que se le asemeja y así sensibiliza al animal a un estímulo doloroso subsiguiente, como la presión en la pata. Entonces se puede cuantificar la inflamación de la pata y el tiempo que tarda en retirarla.

En el caso de *Mycobacterium leprae*, la infección tiene que hacerse en la almohadilla porque es el único lugar que permite el crecimiento del organismo.

Resumen del protocolo para *Mycobacterium leprae*

Mycobacterium leprae se inyecta subcutáneamente en las almohadillas de las extremidades posteriores. La bacteria se inyecta en una suspensión salina hasta un máximo de 10 µl. La infección resultante se limita a las almohadillas y se puede cuantificar fácilmente. No se desarrollan lesiones macroscópicas. En el caso de los ratones desnudos la infección se desarrolla a un alto nivel y puede producirse cierta inflamación de la almohadilla.

- Si se inyecta en ambas almohadillas se interfiere con la locomoción, por lo tanto nunca inyecte en más de una pata.
- Vigile estrechamente los animales. Cualquier animal que presente inflamación de la almohadilla acompañada de pérdida de peso, disminución de la ingesta de líquidos, disminución de patrones de comportamiento y/o impedimento de la motilidad normal debe ser sacrificado humanitariamente.
- A los animales se les debe proporcionar una cama blanda. No deben utilizarse suelos de rejilla. La comida y el agua se colocan adyacentes a la cama para evitar que tengan que caminar lejos si les duele la pata (Wolfensohn & Lloyd 1998).
- Limite la frecuencia y gravedad de los efectos adversos limitando el volumen de dosis y asegurando que el material se inyecta en la almohadilla y no en otros tejidos de la pata.

3.17 Vías inusuales

Existen un número de vías que tiene un uso limitado para fines científicos (p.e. intra-anal, intrabursal, intrahepática, intraneural, intraocular, intraesofágica/intragástrica, intrapeneana,

intrarenal, intraespinal, intratecal, intravesicular, peri-, epi- y subdural, retrovulvar y fístula del rumen). Los principios generales para la mejor práctica de estos procedimientos se detallan en la Sección 2 de esta publicación, así como muchos de los problemas y refinamientos están descritos en el resto del documento.

El Grupo de Trabajo tiene interés en contactar con cualquier persona que realice estas técnicas con vistas a publicar un apéndice de este documento.

4 Consideraciones especiales para los animales salvajes

Un número cada vez mayor de publicaciones se refieren al uso de animales salvajes en investigaciones tanto en laboratorio como de campo. Hay información disponible en lo que se refiere a capturas y transporte, ética en el uso de animales salvajes y efectos ecológicos de esta sustracción de animales (Bekoff 1995, Putman 1995, Tribes & Spiellman 1996, Gaunt & Oving 1999, Hawkins *et al.* 2001) sin embargo, la información sobre administración de sustancias a los animales salvajes es escasa y principalmente, la relativa a regímenes anestésicos. En cuanto a la sustancia y la técnica, se aplican los mismos principios que cuando se utilizan animales de laboratorio, pero además hay que tener en cuenta los siguientes puntos:

- Cuando se administran sustancias a animales salvajes que van a permanecer en su ambiente o van a ser retornados a él, hay que reducir al mínimo su contacto con personas. Si, por el contrario, el animal va a ser mantenido en cautividad y se le van a repetir las dosis, será menos estresante para él si se le familiariza y acostumbra a las personas. Las recompensas con comida pueden ayudar mucho en la familiarización y entrenamiento.
- Es esencial estar familiarizado con el comportamiento natural y el hábitat de las especies para decidir el modo menos estresante de manejarlos. Los ratones salvajes por ejemplo, sienten a menudo pánico y saltan de un lado para otro intentando escapar si se les maneja en áreas abiertas y con luz brillante, mientras que si se les maneja en un ambiente oscuro o con una luz roja y se les permite permanecer en la sombra, están más calmados. Este descubrimiento es común a muchas especies nocturnas.

- Con las especies salvajes es recomendable la administración de anestésicos o sedantes antes de la administración de sustancias, para minimizar el estrés asociado al manejo durante el procedimiento. Después de la sedación se debe dejar al animal sólo, con poca estimulación, hasta que la droga haga efecto. Puede conseguirse a veces simplemente cubriendo la jaula o cubeta con una tela. Antes de liberar a los animales hay que dejarles recuperarse completamente de la sedación, de otro modo se reducirán sus posibilidades de supervivencia.
- Muchas especies de mamíferos querrán entrar en espacios oscuros como bolsas o cajas. Se debe aprovechar este comportamiento para reducir el estrés general de la técnica. Se les puede inyectar entonces a través de la bolsa o dentro de la caja, si está equipada con un sistema de inmovilización. Por ejemplo los conejos silvestres pueden ser inmovilizados en una bolsa de tela negra de la que asomen únicamente las orejas y de este modo se le inyecta en la vena marginal. Las ratas salvajes se precipitarán dentro de bolsas negras o tubos y de este modo pueden transportarse hasta una cámara de inducción para anestesiarlas por inhalación. Las ardillas frecuentemente se refugian en cajas nido cuando le son aproximadas y de este modo pueden ser transportadas a cámaras ventiladas.
- Algunas aves entran en un estado de inmovilidad tónica (IT) mientras son manipuladas, o durante el procedimiento, lo que puede facilitar la administración de sustancias. Se cree que la IT es una respuesta aguda debida al miedo y no es un estado de “hipnosis”, por lo que nunca se les debe inducir deliberadamente este estado que producirá un estrés evitable. Las aves pueden recuperarse rapidísimamente de la IT por lo que la inmovilización debe mantenerse continuamente hasta que se ha completado el procedimiento.

El modo menos estresante de administrar a los animales salvajes es por vía oral, simplemente añadiéndoles la sustancia a su dieta normal (ver Sección 3.10.1) o untándosela sobre su piel de donde ellos probablemente la lamerán durante el acalamiento. En especies predatoras es posible a veces presentarles la sustancia dentro de presas muertas. Por ejemplo, una solución o suspensión de una sustancia en una solución de gelatina al

5% (libre de encefalopatía espongiiforme bovina) puede inyectarse en el abdomen de un pollo muerto pre-congelado. La gelatina se pone dentro del pollo sin que se produzcan pérdidas y se sirve para alimentar al animal. Cuando se tiene que poner una inyección, la vía subcutánea es la menos dolorosa y la menos estresante.

El procedimiento **más estresante** es la administración intraperitoneal, por lo que debe evitarse. La inyección intramuscular es generalmente rápida y menos estresante, pero puede implicar dolor local persistente y necrosis, lo que en algunas especies puede conducir a automutilación e incapacidad de escapar a los predadores si es posteriormente liberado al medio natural

Agradecimiento: Los autores desean dar las gracias a Mr. D. Ruty quien asistió como Observador del Ministerio del Interior.

Nota: Durante la preparación de este documento el Grupo de Trabajo tuvo conocimiento de que EFPIA (European Federation of Pharmaceutical Industries Associations / Federación Europea de Asociaciones de Industrias Farmacéuticas) y ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods / Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos) también estaban elaborando una “Guía de Buenas Prácticas para la Administración de Sustancias y Extracción de Sangre, incluyendo Vía y Volúmenes” para publicar en *Journal of Applied Toxicology* (Revista de Toxicología Aplicada). Ambos reportajes tienen como objetivo asegurar una buena –si no la mejor– práctica.

Referencias

- ALZA Corporation (1990) Product review: Neuroscience Now. *Nature* **347**, 784
- Animal Welfare Information Centre (1997) *Information Resources for Adjuvants and Antibody Production. Comparisons and Alternative Technologies 1990-1997*, AWIC Resource Series No. 3. USDA, USA
- Barclay RJ, Herbert WJ, Poole TB, eds (1988) *The Disturbance Index: A Behavioural Method of Assessing the Severity of Common Laboratory Procedures on Rodents*. Potters Bar: UFAW, p 36
- Bekoff M (1995) Marking, trapping and manipulating animals: some methodological and ethical considerations. In: *Wildlife Mammals as Research Models: In the Laboratory and Field* (Bayne KAL, Kreger MD, eds). Greenbelt, MD: Scientists Center for Animal Welfare, pp 31-47
- Bennett B, Check IJ, Olsen MR, Hunter RL (1992) A comparison of commercially available adjuvants for use in research. *Journal of Immunological Methods* **153**, 31-40

- Brattelid T, Smith AJ (2000) Methods of positioning fish for surgery or other procedures out of water. *Laboratory Animals* **34**, 430-3
- Cambron H, Latulippe JF, Nguyen T, Cartier R (1995) Orotracheal intubation of rats by transillumination. *Laboratory Animal Science* **45**, 303-4
- Claasen V (1994) Neglected factors in pharmacology and neuroscience research. Biopharmaceutics, animal characteristics, maintenance, testing conditions. In: *Techniques in the Behavioural and Neural Sciences*, Vol. 12 (Huston JP, series ed). Amsterdam: Elsevier, p 486
- Collins JM (1987) Role of preclinical pharmacology in phase I clinical trials: considerations of schedule dependence. In: *Concepts, Clinical Developments and Therapeutic Advances in Cancer Chemotherapy* (Muggia FM, ed). Martinus: Nijhoff Publishers, pp 129-40
- Davies A, Dallak M, Moores C (1996) Oral endotracheal intubation of rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Laboratory Animals* **30**, 182-3
- Fielder RJ, Gaunt IF, Rhodes C, Sullivan FM, Swanston DW (1987) A hierarchical approach to the assessment of dermal and ocular irritancy: a report by the British Toxicology Society Working Party on irritancy. *Human Toxicology* **6**, 269-78
- Flecknell PA, Liles JH, Williamson HA (1990) The use of lignocaine-prilocaine local anaesthetic cream for pain-free venepuncture in laboratory animals. *Laboratory Animals* **24**, 142-6
- Friedman AH, Walker CA (1972) The acute toxicity of drugs acting at cholinergic sites and twenty-four hour rhythms in brain acetylcholine. *Archives of Toxicology* **29**, 39-49
- Gaunt AS, Oving LW (1999) *Guidelines on the Use of Wild Birds in Research*, 2nd edn. Washington DC: The Ornithological Council
- Gregory DJ (1995) Practical aspects of continuous infusion in rodents. *Animal Technology* **46**, 115-30
- Healing G, Smith D, eds (2000) *Handbook of Preclinical Continuous Infusion*. London: Taylor and Francis
- Hawkins P, Morton DB, Cameron D, Cuthill I, Francis R, Freire R, Gosler A, Healy S, Hudson A, Inglis I, Jones A, Kirkwood J, Lawton M, Monaghan P, Sherwin C, Townsend P (2001) Laboratory birds: refinements in husbandry and procedures. Fifth report of the BVA/AVF / FRAME / RSPCA / UFAW Joint Working Group on Refinement. *Laboratory Animals*
- Home Office (1994) Guidelines on eye irritation tests. *Report of the Animal Procedures Committee 1994*. London: HMSO, pp 12-14
- Jackson LR, Fox JG (1995) Institutional policies and guidelines on adjuvants and antibody production. *ILAR Journal* **37**, 141-52
- Jennings M, Batchelor GR, Brain PF, Dick A, Elliott H, Francis RJ, Hubrecht RC, Hurst JL, Morton DB, Peters AG, Raymond R, Sales GD, Sherwin CM, West C (1998) Refining rodent husbandry: the mouse. *Laboratory Animals* **32**, 233-59
- Kennedy AL, Stock, MF, Alarie Y, Brown WE (1989) Uptake and distribution of ¹⁴C during and following inhalation exposure to radioactive toluene diisocyanate. *Toxicology & Applied Pharmacology* **100**, 280-92
- Kirk RW (1980) *Editor Current Veterinary Therapy*, 7th edn. Pennsylvania: WB Saunders, p 1360
- Kirk RW, Bistner SI (1985) *Handbook of Veterinary Procedures & Emergencies* Company
- Laboratory Animal Science Association (1998) *Good Practice Guidelines*. Tamworth: LASA
- Lax ER, Militzer K, Trauscheal A (1983) A simple method for oral administration of drugs in solid form to fully conscious rats. *Laboratory Animals* **17**, 50-4
- Leenars PP, Savelkoul HF, Hendriksen CF, van Rooijen N, Classen E (1997) Increased adjuvant efficacy in stimulation of antibody responses after macrophage elimination in vivo. *Immunology* **90**, 337-43
- Lewis RE, Kuuz AL, Bell RE (1966) Error of intraperitoneal injections in rats. *Laboratory Animal Care* **16**, 505-50
- Manser CE (1992) *The Assessment of Stress in Laboratory Animals*. Horsham: RSPCA, p 208
- Melnick RL, Jameson CW, Goehl TJ, Kuhn GO (1987) Application of microencapsulation for toxicology studies. I. Principles and stabilization of trichloroethylene in gelatinorbitol microcapsules. *Fundamental Applied Toxicology* **8**, 425-31
- Morris TH, Jackson RK, Acker WR, Spencer CK, Drag MD (1997) An illustrated guide to endotracheal intubation in small non-human primates. *Laboratory Animals* **31**, 157-62
- Morton DB, Abbot D, Barclay R, Close BS, Ewbank R, Gask D, Heath M, Matic S, Poole T, Seamer J, Southey J, Thompson A, Trussell B, West C, Jennings M (1993) Removal of blood from laboratory mammals and birds. First report of the BVA/ FRAME/ RSPCA/ UFAW Joint Working Group on Refinement. *Laboratory Animals* **27**, 1-22
- Nau H (1985) Teratogenic valproic acid concentrations: infusion by implanted minipumps vs conventional injection regimen in the mouse. *Toxicology of Applied Pharmacology* **80**, 243-50
- Organization of Economic Co-operation and Development (1992) *Guidelines for Testing of Chemicals. Guideline No. 405-Acute Eye Irritation/ Corrosion*. OECD, 2 rue André Pascal, 75775 Paris Cedex 16, France.
- Organization of Economic Co-operation and Development (1992) *Guidelines for Testing of Chemicals. Guideline No. 406-Skin sensitization*. OECD, 2 rue André Pascal, 75775 Paris Cedex 16, France
- Paget GE, Thomson R (1979) *Standard Operating Procedures in Toxicology*. Lancaster: MTP Press Ltd
- Palmer D, Masters A, Deol H (1997) Polyclonal antibody production and adjuvants - a dilemma. *ANZCCART News* **10**, 2-5
- Phalen RF (1984) *Inhalation Studies, Foundations and Techniques*. CRC Press Inc, USA
- Poole T, ed (1987) *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*, 6th edn. England: Longman Scientific & Technical, p 933

- Poole T (1997) Happy animals make good science. *Laboratory Animals* **31**, 116-24
- Putman R (1995) Ethical considerations and animal welfare in ecological field studies. In: *Ecologists and Ethical Judgements* (Cooper NS, Carling CW, eds). London: Chapman and Hall
- Rao GN (1986) Significance of environmental factors of the test system. In: *Managing Conduct and Data Quality of Toxicology Studies* (Hoover BK, Baldwin JK, Kelner AF, eds). USA: Princetown Scientific Publishing, pp 173-86
- Reinhardt V (1991) Training adult male rhesus monkeys to actively cooperate during in-homecage venipuncture. *Animal Technology* **42**, 11-17
- Reinhardt V (1997) Training non-human primates to cooperate during blood collection: a review. *Laboratory Primate Newsletter* **36**, 1-4
- Reynolds JEF, ed (1996) Martindale: *The Extra Pharmacopoeia*, 31st edn. London: Royal Pharmaceutical Society, p 2739
- Richardson ML (1993) *Dictionary of Substances and their Effects*. Cambridge: Royal Society of Chemistry
- Rollin BE, Kessel ML, eds (1990) *The Experimental Animal in Biomedical Research. Volume 1. A Survey of Scientific and Ethical Issues for Investigators*. USA: CRC Press Inc
- Sanderson DM (1959) A note on glycerol formal as a Solvent in toxicity testing. *Journal of Pharmacology* **11**, 150-6
- Schrier JE, ed (1997) Getting cynomolgus (and others) to take their medicine. *Laboratory Primate Newsletter* **36**, 4-5
- Seabaugh VM, Chambers WA, Green S, Gupta KC, Hill RN, Hurley PM, Lambert LA, Lee CC, Lee JK, Lius PT, Lowther DK, Roberts CD, Springer JA, Wilcox NL (1993) Use of ophthalmic topical anaesthetics. *Food & Chemical Toxicology* **31**, 95-8
- Sedgwick CJ (1988) Anaesthesia for non-domestic mammals. In: *Contemporary Issues in Small Animal Practice - Volume 9: Exotic Animals* (Jacobson ER, Kollias VC, eds). London: Churchill Livingstone
- Spiegel AJ, Noseworthy MM (1963) Use of non-aqueous solvents in parenteral products. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **52**, 917-27
- The Merck Index (1968) *An Encyclopaedia of Chemical and Drugs*, 8th edn (Stecher PG, ed). Rahway, NJ: Merck & Co Inc
- Theeuwes F, Yum IS (1976) Principles of the design and operation of generic osmotic pumps for the delivery of semisolid or liquid drug formulations. *Annals of Biomedical Engineering* **4**, 343-53
- Tribe A, Spielman D (1996) Restraint and handling of captive wildlife. *ANZCCART News* **9**, Insert - Fact sheet
- Tuffery AA, ed (1995) *Laboratory Animals: An Introduction for Experimenters*, 2nd edn. Surrey: Wiley, p 392
- van Wijk H (1997) A continuous intravenous infusion technique in the unrestrained mouse. *Animal Technology* **48**, 115-28
- van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC (1993) *Principles of Laboratory Animal Science: A Contribution to the Humane Use and Care of Animals and to the Quality of Experimental Results*. Amsterdam: Elsevier, p 389
- Vermeulen JK, de Vries A, Schlingmann F, Remie R (1997) Food deprivation: common sense or non-sense? *Animal Technology* **48**, 45-54
- Vogel WH (1993) The effect of stress on toxicological investigations. *Human & Experimental Toxicology* **12**, 265-71
- Waynforth HB (1995) General aspects of the administration of drugs and other substances. In: *Laboratory Animals: An Introduction for Experimenters*, 2nd edn (Tuffery AA, ed). Surrey: Wiley p 392
- Waynforth HB, Flecknell PA (1992) *Experimental Surgical Techniques in the Rat*, 2nd edn. London: Academic Press
- Weihe WH (1973) The effect of temperature on the action of drugs. *Annual Review of Pharmacology* **13**, 409-25
- Wolfensohn S, Lloyd M (1998) *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare*, 2nd edn. Oxford: Oxford University Press, p 334
- Wollnik F (1989) Physiology and regulation of biological rhythms in laboratory animals: an overview. *Laboratory Animals* **23**, 107-25
- Zinko U, Jukes N, Gericke C (1997) *From Guinea-pig to Computer Mouse. Alternative methods for a humane education*. EuroNICHE, p 229

The Design of Animal Experiments

Reducing the use of animals in research through better experimental design

LABORATORY ANIMAL HANDBOOKS NO. 14

**Michael F W Festing, Philip Overend,
Rose Gaines Das, Mario Cortina Borja,
Manuel Berdoy**

Cuando no hay alternativa al uso de animales de experimentación en investigación biomédica, es importante que los experimentos estén bien diseñados y analizados correctamente para alcanzar la mayor probabilidad de obtener resultados científicamente válidos. Los experimentos que utilizan un número demasiado pequeño de animales pueden fracasar a la hora de lograr efectos biológicos importantes, mientras que los que usan demasiados animales o los utilizan incorrectamente pueden someterlos a dolor, angustia o daño duradero innecesarios.

Este libro está dirigido a todos los investigadores científicos que utilizan animales de laboratorio, con el propósito de ayudarles a diseñar sus propios experimentos de un modo más efectivo y para mejorar su capacidad para comunicarse con profesionales de la estadística cuando tienen que diseñar experimentos más complejos. El libro cubre muchos aspectos del diseño experimental, tal como la elección del animal experimental, textos de estadística. Por el contrario, no cubre los diseños estadísticos o métodos estadísticos más avanzados, por lo que idealmente debería utilizarse junto con textos con textos de estadística convencionales.

Contenidos: Agradecimientos; Prólogo; Principios básicos del diseño de los experimentos con animales; Elección del animal; comprendiendo y controlando la variación; El diseño de experimentos; Determinación del tamaño de muestra; Presentación e interpretación de los resultados y toma de decisiones; Conclusiones: puesta en común del proyecto; Apéndice 1: notas breves sobre paquetes estadísticos; Apéndice 2 otras lecturas; Bibliografía; Índice

Precio: £14.00/US\$28.00

1-85315-513-6

Rústica, 120 páginas

Enero 2002

Publicado por RSM Press en nombre
de Laboratory Animal Ltd.

For orders in the USA

return the form below to

Balogh International
1911 North Duncan Road, Champaign
Illinois, 61822, USA

Tel +1 217 355 9331; Fax +1 217 355 9413

Or visit the website at www.balogh.com

For all other orders

return the form below to

Marston Book Services
PO Box 269, Abingdon
Oxfordshire OX14 4YN, UK

Tel +44 (0)1235 465 500; Fax +44 (0)1235 465 555

Or order online at www.rsmprss.co.uk

The specifications in this advert, including price, format, extent, and month of publication, were accurate at the time of printing

Please send me:

___ copies of *The Design of Animal Experiments*

LA HANDBOOKS NO 14(1-85315-513-6) @ £14.00/US\$28.00

Add postage and packing:

(£2 per book UK, £3.50 Europe, £7.00 rest of world)

(USA orders \$5 per book for ground LPO)

TOTAL _____

USA



- I enclose a cheque (payable to Balogh International)
 Invoice me for (invoicing for institutional customers only)
 or please charge my account

VISA/MASTERCARD

TOTAL \$ _____

Other



- I enclose a cheque (payable to Marston Book Services)
 Invoice me for
 or please charge my account

VISA/MASTERCARD/AMEX/SWITCH (issue no _____)

TOTAL £ _____

Card no _____

Exp date _____ / _____ Signature _____

Name _____

Address _____

Country _____ Post/ZIP code _____

Tel _____ Fax _____

If the credit card registered address differs from above please give details _____

please tick this box if you do not wish to receive promotional material

01 LA 14



Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio



La Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL), se constituyó en 1989, con carácter exclusivamente científico y sin ánimo de lucro.

Los objetivos principales de la SECAL son racionalizar y mejorar la utilización, el conocimiento y la protección del Animal de Laboratorio al servicio de la salud del hombre y de los animales, procurando que los miembros de la Sociedad ejerzan la profesión con competencia y dignidad, fomentando la relación y cooperación entre los mismos, así como difundir todas las informaciones científicas y técnicas relativas al Animal de Laboratorio, a través de la organización de Cursos de Formación y el

Congreso Nacional de la Sociedad que se celebra cada 2 años.

Podrán pertenecer a esta Sociedad todas aquellas personas relacionadas profesionalmente con las Ciencias del Animal de Laboratorio.

La SECAL es miembro de FELASA, Federation of European Laboratory Animal Science Associations y de ICLAS, International Council for Laboratory Animal Science. FELASA proporciona un foro único de discusión a través del cual sus miembros pueden expresar un punto de vista europeo colectivo ante Organismos como la Unión Europea, el Parlamento Europeo e ICLAS.

Para conseguir más información sobre la Sociedad, dirigirse mediante internet a la página web:

<http://www.secal.es>

Secretaría de la S.E.C.A.L.:

Facultad de Medicina de la UAM (SECAL), C/ Arzobispo Morcillo 4, 28029 Madrid.

Email: cfcriado@uam.es, Tel: +34 1 397 54 76, Fax: +34 1 397 53 53.

Laboratory Animals Ltd.

Laboratory Animals Ltd. es una compañía limitada Británica con carácter benéfico no lucrativo, fundada en 1967. Su principal objetivo es la publicación de la revista *Laboratory Animals*.

Laboratory Animals publica artículos, revisados por expertos, acerca de todos los aspectos relacionados con los animales de laboratorio en la investigación biomédica. Se distribuye a más de 50 países, siendo la revista oficial de varias Sociedades Europeas dedicadas a las Ciencias del Animal de Laboratorio, como: FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) LASA (Laboratory Animal Science Association) GV-SOLAS (Gesellschaft für Versuchstierkunde) ILAF (Israeli Laboratory Animal Forum) NVP (Nederlandse Vereniging voor Proefdierkunde) SGV (Schweizerische Gesellschaft für Versuchstierkunde) y SECAL (Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio).



La compañía publica además monografías dentro de la serie *Laboratory Animals Handbooks*, encargándose de otras actividades, como la aportación de fondos para promover la formación en la tecnología, ciencia y bienestar del animal de laboratorio.

Laboratory Animals Ltd. está comprometida en la difusión de los principios de Russell y Burch sobre el Reemplazamiento, Reducción y Refinamiento, en todos los campos relacionados con el animal de experimentación. Además de la promoción de este concepto a través de la revista y otras publicaciones, otorga becas, financia conferenciantes en reuniones científicas y proporciona material de formación para su distribución a la comunidad científica.

La compañía está regida por un Consejo de Dirección formado por miembros de diferentes países.

Para más información sobre la Compañía o la revista incluyendo el acceso on-line, puede dirigirse mediante internet a la dirección:

<http://www.lal.org.uk> o bien por fax al +44 1279 62 2573