

Diagnóstico del estado de bienestar animal en el bioterio de producción de ratones de la cepa CF-1 del Instituto de Salud Pública de Chile

Diagnosis of the state of animal welfare in the animal facility for the production of CF-1 strain mice at Public Health Institute of Chile

✉ Ramírez, I.¹; Sanhueza, M.J.¹; Risso, S.²; López, C.¹; Mezzano, M.¹

✉ 1 Departamento Nacional y de Referencia en Salud Ambiental, Instituto de Salud Pública de Chile; 2 Facultad de Medicina Veterinaria y Agronomía de la Universidad De Las Américas.

✉ Autor para correspondencia: Isaac Ramírez Rodríguez email:iramirez@ispch.cl

RESUMEN

El Instituto de Salud Pública de Chile, es el laboratorio de excelencia del Estado de Chile, es la entidad de referencia nacional en los ámbitos de la microbiología, inmunología, bromatología, farmacología, laboratorio clínico, contaminación ambiental y salud ocupacional. Cuenta con 6 departamentos, siendo uno de ellos el Departamento Nacional y de Referencia en Salud Ambiental, en el cual se encuentra el Subdepartamento de Producción de Insumos Especiales para Laboratorio, encargado del Centro Productor de Animales de Laboratorio (CPAL). La Sección CPAL se divide en dos Unidades: Bioterio Chena y Bioterio Santiago, en esta última se encuentra la producción de ratones de laboratorio cepa CF-1, animales que son enviados a los SEREMIS de Salud y clientes internos del ISP para la detección de marea roja (Toxina diarreica) en moluscos bivalvos, principalmente. Este bioterio es el más grande a nivel nacional, con capacidad de abastecer a todas las entidades públicas y privadas que requieren ratones de laboratorio de la cepa CF-1. En este estudio se muestrearon 303 animales (202 hembras y 101 machos). Durante tres semanas se realizaron observaciones antes y después del cambio a jaula limpia con el objetivo de detectar parámetros de estrés y/o dolor. Se adaptó tabla de Morton y Griffiths con el fin de optimizar la observación de los animales y facilitar el análisis de los resultados, considerando que la muestra fue de una gran cantidad de animales. La aplicación de estas tablas modificadas a partir de las de Morton y Griffiths, permitieron identificar la baja tasa de factores estresantes y/o dolor, presentados en los ratones (11%) del total de la muestra.



Palabras Claves:

Bienestar animal; Ratones cepa CF-1; tabla Morton y Griffiths modificada

Keywords:

Animal welfare; CF-1 mice; Modified Morton and Griffiths table

ABSTRACT

The Public Health Institute of Chile (ISP) has an area dedicated to the production of experimental animals named Center for the Production of Laboratory Animals (CPAL), which is in charge of the production of CF-1 mice strain. These animals are required by laboratories of the Health's SEREMIS and Laboratory of Environmental Chemistry of the ISP for the detection of red tide in bivalve molluscs. The CPAL has the largest animal farm nationwide with the capacity to supply requirements of CF-1 mice from public and private entities. The objective of this study was to perform a diagnosis to determine levels of animal welfare in adult CF-1 mice obtained from Animal Facility at ISP. A total of 303 animals were sampled by detecting stress and pain parameters, before and after cage change. Considering the large number of animals studied, a modified Morton and Griffiths table was used to optimize the observation of the animals and facilitate the analysis of the results. The results demonstrated a low rate of stress and pain in analyzed mice (11%), these observed levels of stress and/or pain were considered mild. No differences in stress levels were observed before and after handling the animals. It was concluded that adult CF-1 mice from Animal Facility of the ISP are produced under conditions of animal welfare and they have a great capacity to adapt to handling.



Copyright © 2022. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de la *Creative Commons Attribution License (CC BY)*. El uso, distribución o reproducción en otros foros esta permitido, siempre que el/los Autor/es y el/los dueño/s de los derechos de autor sean acreditados y que la publicación original sea citada, en concordancia con la práctica académica aceptada. No usar, distribuir o reproducir si no se cumplen con estos términos.

Conflicto de interés. Los autores declaran no tener conflicto de interés

Financiamiento. Los autores declaran ser funcionarios del Instituto de Salud Pública, no habiendo obtenido remuneración ni compensación económica alguna por la elaboración de este artículo.

INTRODUCCIÓN

Los ratones se han utilizado para estudiar la genética de los mamíferos desde principios del siglo XX, mucho antes de que la tecnología permitiese alterar genes específicos. La historia del uso de los ratones como modelo permitió la identificación de numerosas mutaciones y el primer gen se aisló en 1977 (1).

El Bioterio del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) produce animales de laboratorio desde el año 1955 y es el principal centro productor del país, abasteciendo a entidades privadas y públicas de los animales requeridos para el control de marea roja, calidad de fármacos y vacunas, acciones de diagnóstico y referencia de enfermedades infecciosas. La principal demanda corresponde a los ratones a la cepa CF-1 (Cepa de ratón de laboratorio obtenida por Carworth del Laboratorio Missouri, cruzado intensivamente por 20 generaciones. (2), para la realización del método oficial de diagnóstico de las Floraciones de Algas Nocivas (FAN), denominado bioensayo en ratón (3). La vigilancia de las FAN es ejercida por las Secretarías Regionales Ministeriales (Seremis) de Salud y laboratorios privados del área, siendo ambos los principales demandantes de este tipo de animales. Estos ensayos tienen un efecto directo en la economía y en particular en el mercado de exportación y consumo interno de productos del mar.

La demanda de ratones para Bioensayo de Marea Roja ha presentado un notorio aumento desde el año 1995, debido al aumento en la producción y exportación de moluscos bivalvos y la importancia de la vigilancia de la contaminación por marea roja. Esta problemática sanitaria ha producido un aumento sostenido de la demanda de ratones de la cepa CF-1, por parte de las Seremis de Salud, universidades, centros de investigación y laboratorios de empresas particulares. Tales usuarios han expresado su incapacidad de asumir la producción local de ratones, debido a que la implementación y mantención de un bioterio para este fin requiere un alto nivel de inversión en recursos físicos y humanos.

La instalación de un bioterio debe cumplir con las exigencias para la crianza y mantención de animales de laboratorio, a través de un ambiente controlado, otorgando bienestar y salud, para asegurar su reproducción, calidad genética y microbiológica, la cual se refleja en respuestas confiables en las pruebas biológicas en que son empleados. (4).

Así también debe contar con Barreras sanitarias: las cuales son medidas tomadas con el objetivo de impedir el ingreso de agentes perjudiciales al bioterio. Estas pueden ser físicas o químicas por ejemplo autoclaves, puertas herméticas, accesos restringidos, presiones diferenciales y desinfección de materiales. (5).

Actualmente existen en el país muy pocos bioterios de producción, siendo los principales los bioterios del ISP, Servicio Agrícola Ganadero, Facultades de Medicina Norte, Química y Farmacia y Odontología de la Universidad de Chile, y Facultades de Biología y Medicina de la Pontificia Universidad Católica, Centro de Estudios Científicos de Valdivia. A excepción del bioterio del ISP, los otros bioterio han sido desarrollados para satisfacer una demanda interna y no una demanda nacional. Con el correr de los años se ha tomado conciencia sobre los aspectos bioéticos que involucran la utilización de los animales vivos para investigación y se ha legislado al respecto para asegurar su bienestar y uso (6). En Chile, existe la Ley de Protección de los Animales (Ley 20380: sobre protección de animales. Ministerio de Salud. 2009), la cual aborda el tema del uso de animales vivos para experimentación. Sin embargo, carece de una autoridad fiscalizadora definida y no indica en detalle que el uso de animales para experimentación debe ser bajo condiciones establecidas. Un buen bienestar se logra cuando el animal puede adaptarse a su ambiente (interno y externo), satisfaciendo sus necesidades básicas, como la alimentación, y complejas como la expresión de conductas altamente motivadas.

Entre los primeros científicos que abordaron los problemas bioéticos del uso de los animales de experimentación están los Dres. William Russell (zoólogo) y Rex Burch (microbiólogo) que, en 1959, establecieron los principios de las 3 R para la investigación animal: Reemplazar, Reducir y Refinar. (7). Posteriormente



Figura 1: Carros con jaulas identificadas.

| Fecha: | | | | | | | | | | | |
|------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|----------------|------|----------------|------|----------------|------|---------------|------|---------------|------|
| Sala: | Fila carro | | | | | | | | | | |
| Nombre del encargado: | Nº caja: | | | | | | | | | | |
| Mes: | Sexaje de animal: | | | | | | | | | | |
| <i>Apariencia</i> | Puntaje | Primera semana | | Segunda semana | | Tercera semana | | Cuarta semana | | Quinta semana | |
| | | T °C | PTJE | T °C | PTJE | T °C | PTJE | T °C | PTJE | T °C | PTJE |
| Normal | 0 | | | | | | | | | | |
| Pelo en mal estado: Piloerección | 1 | | | | | | | | | | |
| Pelo en mal estado: Falta de acicalamiento, suciedad en pelo | 2 | | | | | | | | | | |
| Perdida de pelo/Posturas anormal: Encorvamiento | 3 | | | | | | | | | | |
| Comportamiento espontaneo | Puntaje | | | | | | | | | | |
| Normal | 0 | | | | | | | | | | |
| Cambios pequeños (Disminución de la interacción con congéneres) | 1 | | | | | | | | | | |
| Cambios moderados/recelo/ mantenimiento en el fondo de la caja | 2 | | | | | | | | | | |
| Animal agresivo/automutilación/temblores/ letargia | 3 | | | | | | | | | | |
| Comportamiento respuesta manipulación | Puntaje | | | | | | | | | | |
| Normal | 0 | | | | | | | | | | |
| Cambios pequeños (Disminución de la interacción con congéneres) | 1 | | | | | | | | | | |
| Cambios moderados (Recelo/mantenimiento en el fondo de la caja.) | 2 | | | | | | | | | | |
| Animal agresivo (temblores, letargia, Agresivo inusual. Automutilación) | 3 | | | | | | | | | | |
| Pérdida de condición corporal | Puntaje | | | | | | | | | | |
| Normal, no hay pérdida de condición corporal o el animal crece normalmente | 0 | | | | | | | | | | |
| Pérdida menor, leve disminución del consumo de alimento y agua | 1 | | | | | | | | | | |
| Pérdida moderada de peso, notoria disminución del consumo de alimento y agua | 2 | | | | | | | | | | |
| Pérdida marcada de peso, el animal no consume alimento y agua | 3 | | | | | | | | | | |
| Movimientos | Puntaje | | | | | | | | | | |
| Normal | 0 | | | | | | | | | | |
| Oscilantes | 1 | | | | | | | | | | |
| Circulares en estrés | 2 | | | | | | | | | | |
| Ataxia, cojeras | 3 | | | | | | | | | | |
| PUNTAJE TOTAL | 0 a 20 | | | | | | | | | | |

PUNTAJACION TOTAL 0-20 (Cuando el animal presenta una puntuación de 3 en más de dos parámetros, todos los "3" pasan a "4").

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Valoración y medidas correctoras en función de la puntuación de cada animal: | |
| 0-4 Normal | 9-14 Sufrimiento intenso. Analgésicos (¿eutanasia?) |
| 4-9 Supervisar cuidadosamente (¿analgésicos?) | 15- 20 Eutanasia (¿suprimir el procedimiento?) |

Figura 2: Tabla Modificada de Morton y Griffiths, permite realizar un seguimiento por semana del animal identificado previamente.

el Brambell Committee en el Reino Unido, elaboró en 1965 un reporte que acuñó el concepto de las Cinco Libertades (aspectos que fueron considerados indispensables para otorgar condiciones mínimas de vida a los animales de producción), las que se referían a aspectos muy básicos, tales como: que los animales no padezcan hambre ni sed, que no sufran malestar físico ni dolor, que no sufran heridas ni enfermedades, que puedan ajustarse a su comportamiento normal y esencial, que no sufran miedo ni angustia. (8).

Por lo anteriormente mencionado, el ISP debe asegurar el bienestar de los animales que mantiene y produce en sus instalaciones. Es importante mencionar que en dicho establecimiento aún no se ha realizado un diagnóstico del cumplimiento de estas disposiciones a través, de tablas de medición de estrés y dolor, por esto, el objetivo de este estudio es aplicarlas para realizar dicho diagnóstico sobre el estado de bienestar en el cual se encuentran los animales producidos en su bioterio. Mediante la modificación de las tablas de Morton y Griffiths, aplicadas para un bioterio de

producción (9).

METODOLOGÍA

Durante el mes de diciembre de 2020 se dispuso de 1440 ratones de la cepa CF-1 con un mes de edad. De este total se calculó un tamaño muestral (N) de 303 animales, los que tuvieron un peso aproximado de 23 g.

El N de 303 animales se obtuvo a través de la aplicación survey monkey que utiliza el modelo para calcular el tamaño de una muestra en una población finita. La fórmula en que se basó este estudio para calcular el N, gracias a la aplicación fue:

$$\text{Tamaño de la muestra} = \frac{z^2 \times p(1-p)}{e^2} \div \left(1 + \left(\frac{z^2 \times p(1-p)}{e^2 N} \right) \right)$$

N = tamaño de la población • e = margen de error (porcentaje expresado con decimales) • z = puntuación z (<https://es.surveymonkey.com/mp/sample-size-calculator/>).

El N calculado permitió trabajar con un error del 5% y un nivel de confianza de 95%. Se seleccionó el N de manera aleatoria.

Los resultados se obtuvieron a partir de la observación de la conducta y signología de cada animal. Para ello se aplicó la tabla de Morton y Griffiths (9), la cual fue modificada para efectos de este estudio.

Los 303 ratones, 101 machos y 202 hembras, se realizaron cruces bigámicos (1 macho con 2 hembras) y se obtuvieron 101 jaulas con dichos cruces. Estas se distribuyeron en 4 salas que estuvieron a cargo de cuatro operadores distintos. En tres salas se seleccionaron 25 jaulas y en la cuarta sala se seleccionó 26, las cuales se identificaron con una tarjeta que indicaba que cruces serían usados

para el estudio de bienestar animal (Figura 1). En todas las salas los parámetros ambientales fueron estándar y en cada medición se anotó los parámetros de temperatura de la sala de donde se obtuvo la medición (Temperatura ambiental: 20-26 °C; Humedad relativa: 30-70 %) (10).

Se presentó la tabla modificada de Morton y Griffiths (Figura 1) para efectos de este estudio. Capacitando a los funcionarios de las salas involucradas para la aplicación de dicha tabla. Se observaron en los ratones distintos aspectos que podrían indicar la presencia de estrés, dolor y se registró en las tablas de mediciones (Figura 2). Las observaciones se realizaron en dos situaciones como parte de la rutina de los animales, antes y después del cambio de jaula, lo cual implicó una manipulación por parte del operador y cambio de

| Variables a considerar y puntuación | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|
| Pérdida de peso (de 0 a 3) | Normal (no hay pérdida de peso o el animal crece normalmente). | 0 |
| | Pérdida de peso inferior al 10%. | 1 |
| | Pérdida de peso entre el 10 y 20%. Posible alteración en el aspecto o cantidad de las heces. | 2 |
| | Pérdida de peso superior al 20%. El animal no consume agua ni alimento. | 3 |
| Aspectos (de 0 a 3) | Normal | 0 |
| | Pelo en mal estado | 1 |
| | Pelo en mal estado y/o presencia de secreciones oculares o nasales | 2 |
| | Postura anormal | 3 |
| Comportamiento espontáneo (de 0 a 3) | Normal | 0 |
| | Pequeños cambios | 1 |
| | Inactividad | 2 |
| | Automutilación, vocalizaciones anormales, animales muy inquietos o inmóviles | 3 |
| Comportamiento en respuesta a la manipulación (de 0 a 3) | Normal | 0 |
| | Cambios pequeños | 1 |
| | Cambios moderados | 2 |
| | Animal agresivo o comatoso | 3 |
| Constantes vitales (de 0 a 3) | Normal | 0 |
| | Cambios pequeños | 1 |
| | Cambios en la temperatura corporal de 1-2 °C, incremento del 30% en frecuencia cardíaca o respiratoria | 2 |
| | Cambios en la temperatura corporal menor a 2°C, incremento del 50% en frecuencia respiratoria o cardíaca. | 3 |
| Nota: Puntuación total: 0-20 (Cuando el animal presenta una puntuación de 3 en más de dos parámetros, todos los "3" pasan a "4"); valoración y medidas correctoras en función de la puntuación de cada animal: 0-4 Normal; 9-14 Sufrimiento intenso. Analgésicos (¿eutanasia?); 4-9: Supervisar cuidadosamente (¿analgésicos?); 15- 20 Eutanasia (¿suprimir el procedimiento?). | | |

| Fecha: | | Temperatura: | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|----|----|-------|------------------------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|--|--|
| Sala: | | Semana de investigación: | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Nombre del encargado: | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Mes: | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Apariencia | CAJAS | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Macho | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Hembra | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Puntaje | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | | |
| Normal | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pelo en mal estado: Piloerección | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pelo en mal estado: Falta de acicalamiento, suciedad en pelo | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Perdida de pelo/Posturas anormal: Encorvamiento | 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Comportamiento espontaneo | Puntaje | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Normal | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Cambios pequeños (Disminución de la interacción con congéneres) | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Cambios moderados/recelo/ mantenimiento en el fondo de la caja | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Animal agresivo/automutilación/temblores/ letargia | 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Comportamiento respuesta manipulación | Puntaje | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Normal | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Cambios pequeños (Disminución de la interacción con congéneres) | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Cambios moderados (Recelo/mantenimiento en el fondo de la caja.) | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Animal agresivo (temblores, letargia, Agresivo inusual. Automutilación) | 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pérdida de condición corporal | Puntaje | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Normal, no hay pérdida de condición corporal o el animal crece normalmente | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pérdida menor, leve disminución del consumo de alimento y agua | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pérdida moderada de peso, notoria disminución del consumo de alimento y agua | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pérdida marcada de peso, el animal no consume alimento y agua | 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Movimientos | Puntaje | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Normal | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Oscilantes | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Circulares en estrés | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ataxia, cojeras | 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PUNTAJE TOTAL | 0 a 20 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PUNTAJACION TOTAL | | 0-20 (Cuando el animal presenta una puntuación de 3 en más de dos parámetros, todos los "3" pasan a "4"). | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Valoración y medidas correctoras en función de la puntuación de cada animal: | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0-4 | Normal | | | | | | | | | | | 9-14 | Sufrimiento intenso. Analgésicos (¿eutanasia?) | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4-9 | Supervisar cuidadosamente (¿analgésicos?) | | | | | | | | | | | 15-20 | Eutanasia (¿suprimir el procedimiento?) | | | | | | | | | | | | | | | |

Figura 3: Tabla Modificada de Morton y Griffiths, permite identificar animales por jaula.

jaula con material de alojamiento nuevo. La rutina de cambio de jaula se realizó una vez por semana para todos los animales del bioterio, por lo tanto, los animales se habituaron a convivir una semana en su jaula sucia, para luego ser cambiados a una jaula con material de alojamiento nuevo. Ambas mediciones se repitieron los días martes para aumentar la confiabilidad de los resultados, con el fin de abarcar el período aproximado de un mes de mediciones. Posteriormente se hicieron los cálculos según las tablas modificadas de Morton y Griffiths (Tabla 1 y Figura 3), para efectos de este estudio.

Los animales que presentaron algún parámetro de estrés y/o dolor fueron marcados con lápiz marcador para su identificación (Figura 4), posterior a esto se identificó la jaula con banderitas adhesivas de color en el tarjetero, para realizar el seguimiento en las próximas semanas del estudio.

Una vez registrados los datos de los distintos operadores en las 3 semanas que duró el estudio, se ordenaron para evaluar sus resultados.



Figura 4: Animal identificado con cambios moderados/recelo, después de la manipulación.

El diseño del estudio no alteró el quehacer diario de los operarios, con el objetivo que los resultados fueran representativos de la rutina.

RESULTADOS

Elección de parámetros de estrés y dolor definidos en la tabla de Morton y Griffiths.

Estos métodos se basan fundamentalmente en la detección de signos clínicos o alteraciones comportamentales manifiestas. En la actualidad, uno de los métodos más precisos es un

tar el análisis de los resultados, se adaptaron dos tablas para ser aplicadas, y una tercera para identificar a cada animal, a partir de la tabla de Morton y Griffiths, considerando que la muestra fue de una gran cantidad de animales y resultaba poco práctico ocupar la tabla original de Morton y Griffiths (Figura 5).

Se identificó el número de jaula y el sexo del animal que presentará algún parámetro alterado. En ese sentido, se identificaron 7 hembras con diferentes parámetros alterados, con lo cual se puntuó en la tabla. El puntaje total fue la sumatoria

Tabla 2. Detalle de las modificaciones de la tabla de Morton y Griffiths

| Tabla de Morton y Griffiths | Tabla modificada para este estudio | Tipos Cambios |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Aspectos</p> <p>1 Normal</p> <p>2 Pelo en mal estado</p> <p>3 Pelo en mal estado y/o presencia de secreciones oculares o nasales</p> <p>4 Postura anormal</p> | <p>Apariencia</p> <p>1 Normal</p> <p>2 Pelo en mal estado: Piloerección</p> <p>3 Pelo en mal estado: Falta de acicalamiento, suciedad en pelo</p> <p>4 Perdida de pelo/Posturas anormal: Encorvamiento</p> | <p>Se complementa información en el punto de apariencia.</p> |
| <p>Constantes vitales</p> <p>1 Normal</p> <p>2 Cambios pequeños</p> <p>3 Cambios en la temperatura corporal de 1-2 °C, incremento del 30% en frecuencia cardiaca o respiratoria.</p> <p>4 Cambios en la temperatura corporal menor a 2 °C, incremento del 50% en frecuencia respiratoria o cardiaca.</p> | <p>Movimientos</p> <p>1 Normal</p> <p>2 Oscilantes</p> <p>3 Circulares en estrés</p> <p>4 Ataxia, cojeras</p> | <p>Se reemplaza por nuevo parámetro, ya que los ratones también manifiestan el dolor con cambios de comportamiento</p> |

examen clínico detallado (signos respiratorios, evaluación de pelaje, observación de sus ojos, posturas motoras, pérdida de peso, anomalías en la orina y heces) (11).

Se aplicó la tabla de supervisión de Morton y Griffiths para la realización de este estudio (Anexo 3). Esta tabla se creó para los centros de investigación de animales y dado el alto número de animales que participaron en el estudio se hizo impracticable la medición de parámetros como frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y temperatura corporal. A continuación, se indican las modificaciones realizadas (Tabla 2).

Tablas modificadas para ser aplicadas en bioterio de Producción

Con el fin de optimizar la observación de los animales y facili-

tar el análisis de los resultados, se adaptaron dos tablas para ser aplicadas, y una tercera para identificar a cada animal, a partir de la tabla de Morton y Griffiths, considerando que la muestra fue de una gran cantidad de animales y resultaba poco práctico ocupar la tabla original de Morton y Griffiths (Figura 5).

Se identificó el número de jaula y el sexo del animal que presentará algún parámetro alterado. En ese sentido, se identificaron 7 hembras con diferentes parámetros alterados, con lo cual se puntuó en la tabla. El puntaje total fue la sumatoria

y se contrastó con la tabla de valoración de puntaje. De las 7 hembras, 6 presentaron parámetros alterados, pero de igual forma se clasificaron como normales según la puntuación indicada por Morton y Griffiths, mientras que la hembra con parámetro alterado continuó con supervisión. Luego de una semana, se realizó la misma observación a las jaulas identificadas previamente y se observó que la hembra con parámetro alterado obtuvo un puntaje total de 4, equivalente a un estado Normal.

Factores de estrés y dolor en los cruces de ratones de la cepa CF-1 (2 hembras y 1 macho), producidos en el bioterio del CPAL del ISP.

Según los resultados, la frecuencia de observaciones de

Fecha: 15 /12/ 2020
 Sala: 4
 Nombre del encargado: ISAAC ARGUMENTER
 Mes: DICIEMBRE

Temperatura de Sala: 21,4
 Semana de investigación: PRIMERA

| Apariencia | Puntaje | CAJAS | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------------------------------------------------------|----------------|-------|--------|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | | Macho | Hembra | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Normal | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 |
| Pelo en mal estado: Piloerección | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Pelo en mal estado: Falta de acicalamiento, suciedad en pelo | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Perdida de pelo/Posturas anormal: Encorvamiento | 3 | | | | | | | | | | | | 3 | | | | | | | | | | | | | | |
| Comportamiento espontaneo | Puntaje | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 3 | | | | | | |
| Normal | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cambios pequeños (Disminución de la interacción con congéneres) | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cambios moderados/recelo/ mantenimiento en el fondo de la caja | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Animal agresivo/automutilación/temblores/ letargia | 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Comportamiento respuesta manipulación | Puntaje | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Normal | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cambios pequeños (Disminución de la interacción con congéneres) | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cambios moderados (Recelo/mantenimiento en el fondo de la caja) | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Animal agresivo (temblores, letargia, Agresivo inusual. Automutilación) | 3 | | | | 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pérdida de condición corporal | Puntaje | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Normal, no hay pérdida de condición corporal o el animal crece normalmente | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Pérdida menor, leve disminución del consumo de alimento y agua | 1 | | | | | | | | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | |
| Pérdida moderada de peso, notoria disminución del consumo de alimento y agua | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pérdida marcada de peso, el animal no consume alimento y agua | 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Movimientos | Puntaje | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Normal | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Oscilantes | 1 | | | | 1 | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Circulares en estrés | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ataxia, cojeras | 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PUNTAJE TOTAL | 0 a 20 | | | | 5 | | | | | 3 | | | | | 4 | | | | | | | 4 | 3 | | 1 | | 3 |

PUNTAJACION TOTAL 0-20 (Cuando el animal presenta una puntuación de 3 en más de dos parámetros, todos los "3" pasan a "4").

| Valoración y medidas correctoras en función de la puntuación de cada animal: | |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| 0-4 Normal | 9-14 Sufrimiento intenso. Analgésicos (¿eutanasia?) |
| 4-9 Supervisar cuidadosamente (¿analgésicos?) | 15-20 Eutanasia (¿suprimir el procedimiento?) |

Figura 5: Tabla modificada de Morton y Griffiths.

presencia de dolor y estrés fue muy baja con respecto al total de animales muestreados (Figura 6), por lo que se sugiere que los ratones del Bioterio no tienen muchos factores que les generen estrés y dolor, más que la manipulación del operador y que se adaptan rápidamente a estos factores, ya que la tendencia fue a que las observaciones fueran bajando en frecuencia con el correr de las semanas.

Las Condiciones generales del bioterio Instituto de Salud Pública fueron medidas constantemente por semana de estudio durante un mes, luego se agruparon y graficaron los datos (Figura 7).

Los parámetros que se observaron con mayor frecuencia durante las tres semanas de estudio a nivel general en el bioterio del Instituto de Salud Pública se presentan en el siguiente gráfico y se consideró mostrar el parámetro de cojera, el cual se manifestó en un animal, pero dado la severidad del parámetro se consideró su eutanasia. Se representaron los animales afectados a nivel general en el bioterio del Instituto de Salud Pública, según la puntuación de la tabla modificada de Morton y Griffiths (Tabla 3 y Figura 8).

DISCUSIÓN

La identificación de factores de estrés y dolor en los ratones

del bioterio del Instituto de Salud Pública fue posible luego de muestrear un número considerable de animales, de los cuales un bajo % de animales presentaron algún parámetro alterado (11%). Las tablas de Morton y Griffiths (9), fueron creadas para evidenciar los factores de estrés y dolor en animales de experimentación, por esta razón este estudio se inicia adaptando dichas tablas para un bioterio de producción. Es importante destacar que dicho trabajo no ha sido re-

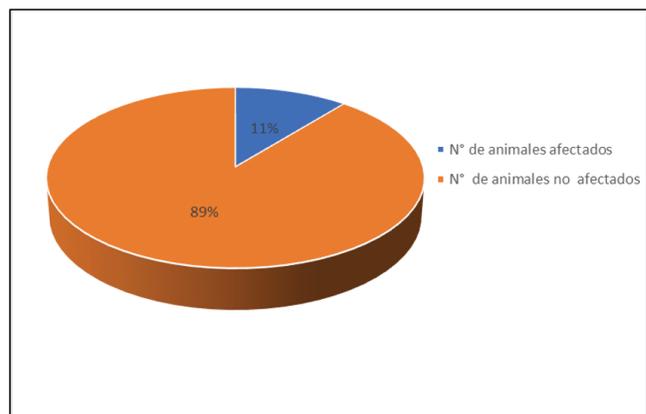
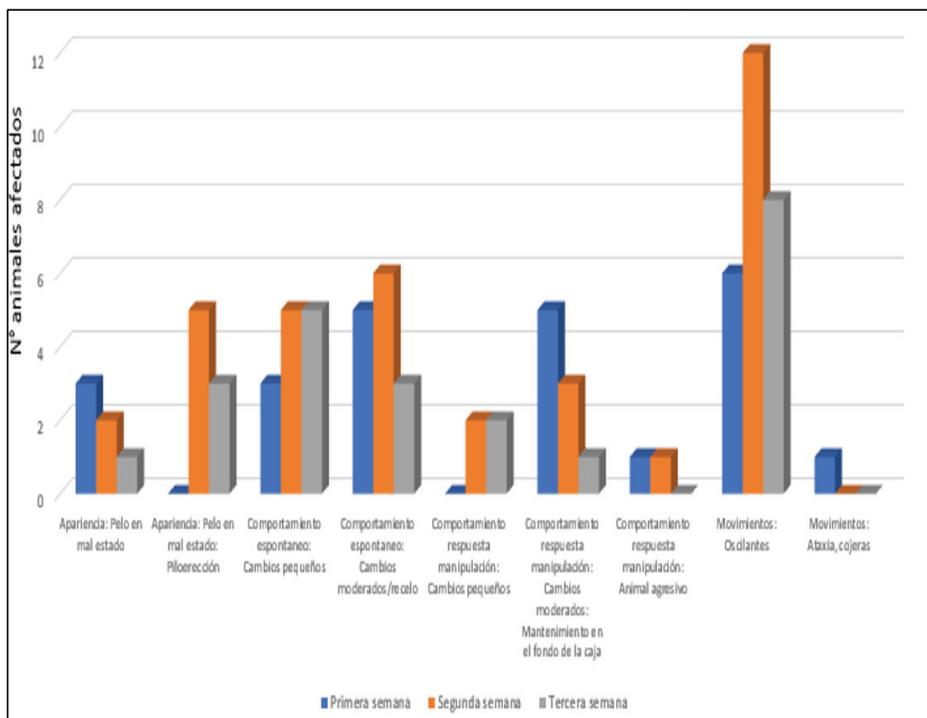


Figura 6. Condición general del Bioterio.



alizado a nivel nacional por otras instituciones, por tanto, no existen datos que puedan ser comparados con los resultados del presente estudio.

Comparando las tres semanas de estudio se puede indicar que, durante la segunda semana de estudio, se observa un leve incremento de animales afectados en comparación con

Tabla 3. Número total de animales dentro del estudio que manifestaron algún parámetro dentro del periodo de estudio.

| Valoración | N° total de animales |
|--------------------------|----------------------|
| 0-4 Normal | 25 |
| 4-9 Supervisar | 13 |
| 9-14 Sufrimiento intenso | 1 |
| 15-20 Eutanasia | 0 |

la primera semana. Sin embargo, ya en la tercera semana se observa una importante reducción en el porcentaje de animales afectados en comparación con la primera y segunda semana. (Los parámetros identificados con mayor frecuencia fueron: piloerección, dolor y estrés).

En cuanto a la condición general del bioterio se puede indicar que, de los 33 animales afectados, sólo 11 animales mantuvieron alguno de estos parámetros durante la tercera semana de estudio. Lo que podría indicar una adaptación a las con-

diciones ambientales, cambio de jaula o a la manipulación.

Los resultados antes y después de la manipulación por el operador dieron el mismo grado de estrés y dolor en cada animal, es decir, que los animales que presentaron estrés o dolor, lo presentaron antes y después de la manipulación. Por otro lado, la mayor parte de los animales no presentó signos de estrés ni dolor, antes, ni después de la manipulación. Esto se podría deber a que los animales de la muestra se encontraban en buenas condiciones de alojamiento, bajo condiciones ambientales adecuadas para la especie y que la manipulación de los animales se realiza de manera correcta, ya que ésta no les genera cambios. Era esperable encontrar mayores signos de estrés, ya que la manipulación de los animales es un factor estresante en sí, sin embargo, esa premisa

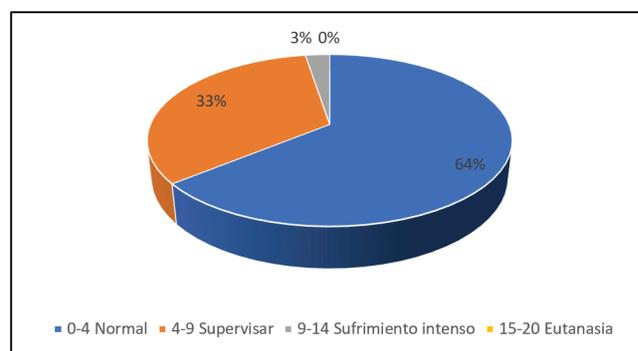


Figura 8: Puntaje obtenido de los animales en estudio

no se observó en este estudio.

Durante la realización de este estudio cabe mencionar, que no se identificaron casos graves para asignar un alto puntaje, según la escala modificada de Morton y Griffiths. Esto se debe a que en los ratones de la muestra no se realizaron inoculaciones, ni manipulaciones que generaran altos niveles de dolor.

De los datos obtenidos por cada operador se concluye que los parámetros con mayor frecuencia encontrados fueron similares entre sí, lo que indica una estandarización en la forma de trabajar.

Se evidenció que los parámetros observados fueron disminuyendo en puntaje a medida que avanzaba las semanas de estudio, esto se puede deber a que hubo una adaptabilidad de los animales a la manipulación y su ambiente.

Se puede concluir por los resultados obtenidos que los ratones muestreados que representan a los animales reproductores, en cruces sin cría presentan muy pocos problemas de estrés y dolor y se adaptan rápidamente a las condiciones ambientales y de manipulación.

Los resultados y conclusiones de este estudio, demuestran la baja tasa de factores estresantes y de dolor, presentados en los ratones muestreados, los cuales representan una parte de los animales producidos en el bioterio del Centro de Producción de Animales de Laboratorio, perteneciente al Instituto de Salud Pública de Chile.

Agradecimientos

Se agradece la participación en este estudio a los funcionarios de Bioterio Santiago: Mario Muñoz Olivares, Daisy Bello Chávez, Mara Pino Peña, por aportar con su buena disposición y profesionalismo en la realización de este estudio.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por el Instituto de Salud Pública de Chile.

Referencias bibliográficas.

1. Capecchi MR. Gene targeting in mice: Functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat Rev Genet.* 2005;6(6):507–12.
2. López Claudia. Descripción de las materias primas utilizadas en Bioterios de cría. Documento interno de CPAL. 2018;1–2.
3. Ian Stewart CM. The laboratory mouse in routine food safety testing for marine algal biotoxins and harmful algal

bloom toxin research: past, present and future. *J AOAC Int.* 2014;97(2):356–72.

4. Romero-Fernandez W, Batista-Castro Z, De Lucca M, Ruano A, García-Barceló M, Rivera-Cervantes M, et al. The 1, 2, 3 of laboratory animal experimentation. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2016;33(2):288–99.

5. Robert Hubrecht JK. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals*, Eighth Edition. 2010. 124–136 p.

6. Cisneros MJ and FJ. Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio Contenido. 1999; Available from: <http://www.uss.cl/wp-content/uploads/2014/12/Guía-para-el-Cuidado-y-Uso-de-los-Animales-de-Laboratorio.pdf>

7. Giraldo LFG, Zuluaga CG. Bioethics in the scientific experiments with animals: A matter of regulation or a human attitude. *Rev Lasallista Investig.* 2013;9(1):159–66.

8. la Betancourt Valladares M, ny Dominguez Montero G, la Casado Hernández I, ys Rodríguez Martín O. Consideraciones éticas en investigaciones experimentales con modelos animales. *Mediciego.* 2015;21(4):81–91.

9. Morton DB GP. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet Rec.* 1985;116(16):431–6.

10. Academies N research C of the N. Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio. 2017. 48–49 p.

11. Medina MG. Reconocimiento y manejo del distres, sufrimiento y dolor en animales de laboratorio: Una revisión. *Suma Psicol.* 2010;17(2):195–200.