

Punción submandibular con aguja de inyección en ratones: comparación de dos procedimientos

Submandibular puncture with injection needle in mice: comparison between two different procedures

FERNÁNDEZ, V.^{1,2}; DOMÍNGUEZ, P.²; GARCÍA, JP.³; ESTEIN, SM.^{1,2}

¹Laboratorio de Inmunología, Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV), Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA), Tandil, Argentina. ²Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN) (UNCPBA-CICPBA-CONICET).

³Servicio de Diagnóstico Veterinario, FCV, UNCPBA, Tandil, Argentina

RESUMEN

La punción del plexo venoso a nivel submandibular en ratones es una técnica aceptada para la obtención de volúmenes de sangre adecuados para análisis de rutina. Si bien se recomienda el uso de lancetas comerciales, en Argentina no están disponibles, por lo tanto pueden sustituirse por agujas de inyección. El objetivo de este trabajo fue comparar el uso de agujas 21G x 1" utilizando dos procedimientos de punción submandibular en ratones BALB/c de 8 semanas de edad: G1) con capuchón cortado a 10 mm (restringiendo la profundidad de la punción) y G2) sin capuchón para determinar: a) volumen de sangre obtenido, b) datos hematológicos y glucemia y c) daño tisular. El volumen de sangre obtenido por la punción submandibular con aguja sin capuchón fue significativamente mayor que el colectado con capuchón. Los valores hematológicos y la glucemia fueron normales para ambos procedimientos. No se observaron daños histológicos en ninguno de los procedimientos empleados. En conclusión, se recomienda el uso de aguja como procedimiento de refinamiento para la obtención de sangre submandibular dado que es económico, práctico, permite obtener un volumen sanguíneo moderado sin provocar daño tisular y asegura la recuperación de los animales.

Palabras clave: (extracción submandibular), (ratones), (aguja con y sin capuchón).

Recibido: 17-07-19

Aceptado: 11-03-20

Correspondencia *e-mail*: Vanesa Fernández vanesaf@vet.unicen.edu.ar

SUMMARY

The puncture of the venous plexus in the submandibular region in mice is an accepted technique to obtain blood volumes suitable for routine clinical analysis. Although the use of commercial lancets is recommended, in Argentina they are not available and they could be replaced by injection needles. The aim of this study was to compare the use of 21G x 1" needles using two different submandibular puncture procedures in 8-week-old BALB/c mice: G1) with cap cut to 10 mm (restricting the depth of the puncture) and, G2) without cap to determine: a) blood volume obtained, b) hematological data and glycaemia and c) tissue damage. The blood volume obtained by submandibular needle puncture without cap was significantly higher than the one collected with cap. Hematological values and glycaemia were normal for both procedures. No histological damage was observed in any of the procedures used. In conclusion, it is recommended the use of needle without cap as a refining procedure to collect submandibular blood since it is cheapest, practical, allows to obtain moderate volumes no causing tissue damage and ensuring the animal recovery.

Keywords: (submandibular bleeding), (mice), (needle with and without cap).

INTRODUCCIÓN

El ratón (*Mus musculus*) continúa siendo un modelo experimental debido a sus características biológicas, genéticas, pequeño tamaño, fácil manejo y prolificidad¹. Existen varios procedimientos para la extracción de sangre en esta especie y la elección de la técnica depende de la cepa, edad del animal y del volumen sanguíneo requerido según el tipo de análisis o estudio en cuestión. En ocasiones, se requiere la extracción de un mayor volumen de sangre y la hipovolemia subsiguiente imposibilita que los animales se recuperen^{3,4}.

Por otra parte, se ha demostrado que tanto el sitio como el procedimiento para la colecta de la sangre pueden alterar los parámetros clínicos y bioquímicos¹. En este sentido, la punción por la vía submandibular es una técnica de implementación sencilla que permite obtener un volumen de sangre de 0,2 ml cada 2 semanas (ratón de 22 g), sin el uso de anestesia y asegurando una pronta recuperación de la volemia tras sucesivas extracciones^{2,3}.

En el 2005, Golde *et al.*, recomendaron la técnica de punción submandibular con lancetas Medipoint® para la obtención de sangre de ratones². Posteriormente, en su reemplazo se utilizaron agujas 21 y 23 G. Los resultados que se obtuvieron fueron similares y no se registraron

signos de dolor ni lesiones aparentes cuando se hicieron sangrados repetidos³. Sin embargo, estos últimos autores confirmaron que el empleo de la lanceta permitía controlar mejor la profundidad de la punción².

En Argentina, el costo elevado y el tiempo de importación necesario para disponer de lancetas comerciales, nos motivó a ensayar el uso de agujas 21 y 23 G para efectuar este procedimiento. El objetivo de este trabajo fue comparar el uso de agujas 21G x 1" utilizando dos procedimientos para la punción submandibular en ratones BALB/c de 8 semanas de edad: G1) con capuchón cortado a 10 mm y G2) sin capuchón para determinar: a) volumen de sangre obtenido, b) datos hematológicos y glucemia y c) daño tisular en extracciones sanguíneas repetidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon 36 ratones BALB/c de 8-10 semanas de edad. Estos permanecieron en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias, U.N.C.P.B.A., recibiendo agua y alimento "*ad libitum*", alojados en un armario ventilado, con condiciones de luz, temperatura y humedad controlados, respetando las normas de cuidado y bienestar establecidas por la Comisión

de Bioética y Bioseguridad de la Facultad. Los procedimientos y protocolos de manejo animal fueron aprobados por el Comité de Ética de acuerdo con la Política de Bienestar Animal (Ley 087/02) de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA), Tandil, [//www.vet.unicen.edu.ar](http://www.vet.unicen.edu.ar). Realizados de acuerdo con las directrices internacionalmente aceptadas en materia de bienestar animal.

Los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos experimentales: G1) con capuchón y G2) sin capuchón. La obtención de sangre con anticoagulante (Wiener Lab.) se realizó por punción submandibular con aguja hipodérmica descartable 21-gauge (21G x 1"; 25x8 mm) (NEOJET®) con y sin su respectivo capuchón en tubos Eppendorf (Figura 1). Las extracciones se practicaron en 3 oportunidades con un intervalo de 11 días (D0, D11 y D22).

Posteriormente, se presionó en el sitio de la punción con una compresa embebida en agua oxigenada para prevenir un posible sangrado prolongado.

El volumen obtenido por cada animal se calculó teniendo en cuenta el número de gotas, por un volumen estimado de 0,15 ml/gota.

Se realizaron las siguientes determinaciones: Hemoglobina (g/dl), Hematocrito (%), Eritrocitos/mm³, Volumen Corpuscular Medio

(fl), Hemoglobina Corpuscular Media (%) y Glucemia (mg/dl) (esta última como referencia del estado metabólico de los ratones).

Dos horas después del último día de sangrado (D22), todos los animales se sacrificaron utilizando anestesia intraperitoneal con ketamina (80 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg) y dislocación cervical. La elección de ambos métodos se realizó teniendo en cuenta que el dolor no se experimenta si el animal está anestesiado o inconsciente y no recupera la conciencia previa al momento de la muerte. Luego, se obtuvo una muestra de tejido submandibular de 1 cm de diámetro para la evaluación del daño tisular en todos los animales. Para dicha muestra se utilizó un bisturí en el sitio de punción submandibular desde el ángulo de la mandíbula (cabello táctil) con una profundidad suficiente que incluyó el hueso mandibular. Las muestras se fijaron en Solución Bouin (formol, ácidos pícrico y acético). Posteriormente, se deshidrataron por inmersión en soluciones de etanol en concentraciones crecientes, luego en alcohol butílico y finalmente se incluyeron en una combinación refinada de parafina altamente purificada con polímeros plásticos (Paraplast). Se realizaron cortes de 4 a 5 µm que se montaron en portaobjetos, se tiñeron con hematoxilina y eosina y se examinaron al microscopio óptico (Leica DM500).



Figura 1. Aguja 21Gx1" con capuchón cortado a 10 mm desde la punta (1) y sin capuchón (2), utilizadas para la obtención de sangre por punción submandibular en ratones G1 y G2, respectivamente.

Análisis estadístico

Los datos de volumen de sangre obtenidos se compararon estadísticamente mediante ANOVA, seguido de la prueba de Bonferroni. Las diferencias con $p \leq 0,05$ se consideraron significativas.

RESULTADOS

No se observaron cambios en el comportamiento de los animales o en sus hábitos alimenticios.

El volumen de sangre total obtenido en el G2 fue significativamente mayor ($p \leq 0,05$) que el obtenido en el G1 (Gráfico 1).

En ambos grupos, las muestras estuvieron libres de hemólisis y los valores hematológicos se mantuvieron dentro de los considerados de referencia durante el primer intervalo de colecta de sangre (D0 y D11, respectivamente). Se observó que el Hematocrito y los Eritrocitos/mm³ disminuyeron entre la segunda y la tercera extracción, aunque siempre se mantuvieron dentro de los valores normales (D11 y D22, respectivamente) (Tabla 1). Por otro lado, los valores de glucosa se mantuvieron en el rango de referencia en ambos

grupos (Tabla 1).

No se registraron cambios en la coloración del pelaje ni lesiones macroscópicas relevantes en la región submandibular punzada en ninguno de los ratones de ambos grupos.

La histopatología de los tejidos en el punto de punción reveló la presencia de edema en el tejido conectivo sin evidencia de inflamación aguda, crónica o necrosis ni alteración de las glándulas salivares parótida y mandibular.

En la Figura 1 se observan las lesiones microscópicas observadas en ratones G1 (a) y G2 (b), 2 h después de la última extracción de sangre (D22). a) Las fibras de colágeno del tejido conectivo (3) entre las glándulas salivales (1) y los músculos mandibulares (2) están separadas por espacios claros (edema). b) Las fibras de colágeno del tejido conectivo (3) entre las glándulas salivales (1), los músculos mandibulares (4) y los vasos linfáticos (2) están separados por espacios claros (edema) (tinción: hematoxilina-eosina 4X).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este trabajo comparamos el uso de las agujas de inyección 21 G con el capuchón

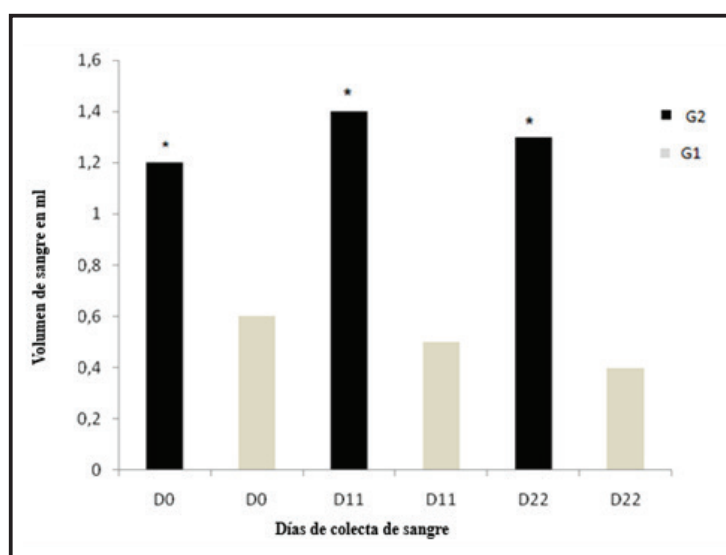
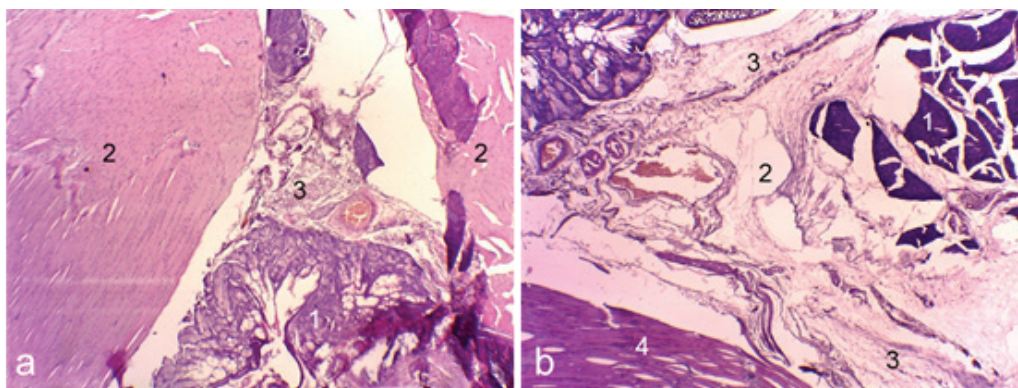


Gráfico 1. Volumen de sangre total (ml) obtenido de los ratones de cada uno de los grupos experimentales (G1 y G2) en tres oportunidades cada 11 días.

Tabla 1. Datos hematológicos y de glucemia obtenidos mediante la extracción de sangre por punción submandibular en los 3 muestreos cada 11 días de intervalo (D0, D11, D22) con y sin capuchón.

PARÁMETROS	GRUPO 1 CON CAPUCHÓN		GRUPO 2 SIN CAPUCHÓN				VALORES DE REFERENCIA
	D0	D11	D22	D0	D11	D22	
Hemoglobina g/dl	13,6	15,2	12,8	13,7	14,4	13,2	12,0-19,0
Hto %	44	47	36	46	44	36	35,0- 55,0
Eritrocitos /mm ³	6.890.000	7.150.000	6.740.000	7.050.000	6.850.000	6.510.000	5.500.000-8.500.000
VCM fl	66	70	82	68	68	77	60,0-77,0
HbCM %	19,4	19,7	17,2	19,6	20,1	17,8	17,0-24,5
Glucemia mg/dl	102	-	89	73	-	81	55,0-120,0

**Figura 2.** Lesiones microscópicas observadas en ratones G1 (a) y G2 b) 2 h después de la última extracción de sangre (D22).

cortado y sin capuchón como alternativas de reemplazo a las lancetas comerciales para la extracción de sangre por punción submandibular. Partimos de la hipótesis de que el dolor ocasionado por el uso de la lanceta o la aguja con capuchón eran semejantes, mientras que la aguja sin capuchón ocasionaría más dolor y trauma por no tener un límite en la profundidad de la punción. Sin embargo, los animales de ambos grupos no mostraron diferencias a nivel macroscópico y el análisis histopatológico reveló sólo la presencia de edema. Por otro lado, la punción mediante la aguja sin capuchón permitió obtener un mayor volumen de sangre en cada muestreo sin sobrepasar el 10% del volumen sanguíneo permitiendo la pronta recuperación de los animales.

Es importante que una técnica de venopunción sea de implementación sencilla, rápida y de bajo costo que permita la obtención de muestras de calidad y la recuperación del animal^{3,4,5}. Por tales motivos, recomendamos para operadores con experiencia en la técnica y en el manejo de los animales la punción submandibular con el empleo de las agujas 21G sin capuchón para los estudios que requieran un volumen máximo aceptable de sangre, el cual corresponde al 10% de su volumen sanguíneo, pero resulta necesario aclarar que para los operadores con poca experiencia recomendamos que utilicen las agujas 21G con capuchón recortado o lanceta ya que tener un límite de profundidad en la punción es fundamental para no cometer posibles errores al momento

de realizarla y provocar alguna lesión o daño tisular, permitiendo asegurar de esta manera la óptima recuperación de los animales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fernández, I., Peña, A., Del Teso, N., Pérez, V. y Rodríguez-Cuesta, J. Clinical biochemistry parameters in C57BL/6J mice after blood collection from the submandibular vein and retroorbital plexus. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2010; 49(2):202-206.
2. Golde, W.T., Gollobin, P. y Rodriguez, L.L. Un método rápido, simple y humano para el sangrado submandibular de ratones usando una lanceta. *Lab Animal.* 2005; 34 (9):39-43.
3. Peña, M., Ríos, M.A., Díez, I., Cano, M.J., García, M.B., Del Ángel, J. y Pérez, C.C. Obtención de sangre por punción mandibular en el ratón: nuestra experiencia. *Revista Española de Investigaciones Quirúrgicas.* 2008; XI (1):3-7.
4. Regan, R. D., Fenyk-Melody, J. E., Tran, S.M., Chen, G. y Stocking K.L. Comparación de la extracción de sangre submental con los métodos retroorbital y submandibular en ratones (*Mus musculus*). *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2016; 55(5):570-576.
5. Sadler, A.M. y Bailey, S.J. Validation of a refined technique for taking repeated blood samples from juvenile and adult mice. *Lab Anim.* 2013;47(4):316-319.