

CAPÍTULO 6

Estandarización de las condiciones ambientales y de alojamiento. Macro y microambiente

Silvana Nora Milocco y María del Pilar Cagliada

Las instalaciones para el cuidado y uso de animales, ya sea en investigación, enseñanza y pruebas, deben favorecer su bienestar y seguridad; asimismo debe proporcionar un lugar de trabajo seguro y con un diseño adecuado para el personal, estableciendo un entorno de investigación sólido (CCAC, 2003). La estandarización de las condiciones ambientales, se logra a través de un buen programa de manejo del ambiente, alojamiento y cuidado, permitiendo a los animales crecer, madurar, reproducirse y mantener una buena salud, de modo que sus patrones metabólicos y de comportamiento se mantengan normales y estables, proporcionando resultados confiables.

Para establecer un ambiente físico y social adecuado, deben considerarse muchos factores (INTA, 2010), entre ellos:

- La especie, variedad y raza de animales y sus características individuales, tales como sexo, edad, tamaño, conducta, experiencia y salud.
- La habilidad de los animales para integrar grupos con sus semejantes, a través de la vista, olfato y posible contacto, ya sea que los animales se mantengan aislados o en grupos.
- El diseño y construcción del alojamiento.
- La disponibilidad y adecuación de elementos que enriquezcan el medio ambiente.
- Las metas del proyecto y el diseño experimental (ej., producción, crianza, investigación, pruebas de laboratorio y educación).
- La intensidad de la manipulación animal y el grado de daño que causen los procedimientos.
- La presencia de materiales peligrosos o que causen enfermedad.
- La duración del período de permanencia de los animales.

El ambiente de los animales presenta tres aspectos fundamentales a tener en cuenta: el ambiente estructural (el edificio propiamente dicho), el ambiente físico (el lugar donde se alojarán los animales) y el ambiente social (relacionado con el comportamiento que van a tener los animales en dicho lugar).

Las variables ambientales influyen directa o indirectamente sobre todos los procesos biológicos y ejercen efecto sobre el bienestar y la respuesta fisiológica. Por consiguiente, al realizar una experiencia, es muy importante conocer los requerimientos fisiológicos y etoló-

gicos de la especie que se va a mantener y producir en el bioterio. Si los animales se encuentran en un estado de disconfort, el estrés va a producir, inevitablemente, alteraciones en los resultados de las pruebas.

El ambiente se puede dividir en dos grandes grupos, el microambiente y el macroambiente, cada uno con sus componentes propios; pero en algunas especies esta división no es tan marcada y los elementos de ambos están integrados. Un ejemplo claro se observa en el ambiente de los peces cebra y en los animales de granja.

Microambiente

También llamado confinamiento primario, es el espacio físico que rodea de manera inmediata a los animales. Tiene su propia temperatura, humedad y composición del aire. Debe reunir determinadas condiciones para asegurar el bienestar de los animales que allí se alojen, a saber:

- Permitir el comportamiento normal de los animales. Esto es algo complicado de lograr en un bioterio, sobre todo cuando se trabaja con roedores, ya que es difícil recrear su ambiente natural.
- Permitir la interacción social y el desarrollo de jerarquías dentro y entre las cajas, jaulas, corrales, caniles, gatiles.
- Los animales deben permanecer limpios y secos, esto se logra si el recinto permite una fácil higiene.
- Debe tener una ventilación adecuada.
- Permitir que los animales tengan fácil acceso al agua de bebida y alimento.
- Debe ser seguro para impedir el escape de los animales o que entren animales salvajes
- Sin superficies filosas que puedan lastimarlos. Cabe recordar que tanto la rata como el ratón son roedores con incisivos de crecimiento continuo, y al roer las cajas, crean bordes cortantes.
- En general, se aconseja que el lugar de alojamiento permita la observación de los animales. De esta manera, se puede evaluar el comportamiento, si consumen el alimento, si se producen peleas, si están enfermos o si se produjo la muerte de algún animal. Son los técnicos y/o cuidadores los que más información nos pueden brindar sobre estos datos, ya que están en contacto permanente y directo con los animales; por este motivo, es fundamental tener una estrecha comunicación con ellos.
- Controlar las condiciones microambientales es importante porque cualquier cambio producen alteraciones en los procesos biológicos y metabólicos, y hacerlos más vulnerables a diferentes enfermedades. Las mediciones de las características del microambiente se pueden realizar con equipos o mediante programas informáticos. Hasta el momento, todos los datos recabados han demostrado que la temperatura, humedad y concentración de gases es mucho mayor aquí que en el macroambiente.

Los factores que componen el microambiente son: las cajas, jaulas, corrales, caniles, gatiles; el lecho; el agua de bebida; el alimento; y la densidad animal.

Cajas o jaulas

Es el medio donde se van a desenvolver los animales. Normalmente, dividen su espacio en cuatro sectores: un sector donde eliminan, otro donde comen, otro sector donde descansan y un área para desarrollar actividades lúdicas. También se les debe proporcionar un lugar adicional para estar en solitario, por si así lo desean. Puede ser una caja, una lata o una pared divisoria que les permita algo de privacidad.

Las cajas deben ser confortables, higiénicas, de fácil limpieza, deben brindar fácil acceso al alimento y al agua de bebida, con una ventilación y tamaño apropiados. Deben fabricarse con materiales resistentes, ya que estarán sometidas continuamente a lavados y manipulación. Deben ser atóxicas, de material anticorrosivo y resistente para poder autoclavarlas, aislantes y de ser posible transparentes para observar el comportamiento. Para los pequeños roedores se utilizan las cajas tipo “*shoe box*” o cajas de zapatos, de policarbonato o polipropileno o acero inoxidable. Estas últimas son más durables, pero tienen la desventaja de ser muy ruidosas, y su peso dificulta las tareas del operador. El diseño debe ser simple, facilitando la introducción del alimento y la mamadera con el agua de bebida. Para ratas también existen cajas con una tapa que tiene una rejilla superior más elevada para que pueda ver hacia el exterior. Con frecuencia los roedores se hospedan en jaulas sobre pisos de alambre mejorando la higiene de las jaulas, permitiendo el paso de las heces y orina, las cuales se depositan en una bandeja colocada debajo. Sin embargo, algunas evidencias sugieren que los alojamientos sobre piso sólido y material de cama son los preferidos de los roedores (Ortman J. A., 1983). Además, las jaulas para ratas presentan la desventaja que solo se les cambia la bandeja inferior, por lo que los animales no están habituados al manejo y a la hora de manipularlas, el experimentador puede tener dificultades.

Corrales, caniles, gatiles

En otras especies, como por ejemplo el cerdo, los pisos deben ser de materiales duros, aislantes, resinas de poliéster, caucho sintético. Pueden tener perforaciones, un declive de 5° y buenos desagües para facilitar la limpieza. El perro se aloja en caniles, los cuales deben tener una zona de recreación al aire libre. Los gatiles deben ofrecer todo tipo de enriquecimiento ambiental, como pasadizos, arboles artificiales, estantes, o perchas, para que los gatos desarrollen su comportamiento normalmente.

Estantes convencionales

Las cajas o jaulas pueden colocarse en estantes convencionales, es aconsejable que sean de acero inoxidable para su mejor desinfección y con ruedas para facilitar la limpieza de la habitación. Con una altura máxima de 170 centímetros. Se aconseja no colocar cajas en el estante superior para que la luz no incida directamente sobre ellas. El ancho puede ser variable, esto depende de la especie a alojar y del espacio de la sala. Estas estanterías tienen la ventaja de permitir colocar distintos tipos de cajas o jaulas.

Cabinas ventiladas

Otra opción, es ubicar las cajas o jaulas en cabinas ventiladas. Estas cabinas, en general de acero inoxidable, presentan cubículos, con filtración individual absoluta en cada uno de ellos, con presión positiva o negativa, dependiendo del ensayo. Las hay de diferentes tamaños, permitiendo alojar diferentes tipos de cajas y/o jaulas. Tienen como desventaja que necesitan de una estación de cambio auxiliar o de un flujo laminar para realizar el cambio de lecho y caja de los animales.

Estantes con ventilación individual o racks ventilados

La alternativa más moderna es la utilización de los racks ventilados. Son de acero inoxidable y de tamaño variable. Tienen filtración absoluta de aire en cada caja, lo que nos permite tener varias experiencias con diferentes animales o especies al mismo tiempo. Al igual que las cabinas necesitan una estación de recambio auxiliar y pueden actuar tanto con presión positiva como negativa. Se puede acoplar más de un rack en el mismo módulo de control. La desventaja es que son muy costosos y permiten alojar cajas de una sola marca. Las cajas tienen además de la rejilla otra tapa superior con filtro. Existen racks ventilados para alojar peces cebra.

Microaisladores

Los microaisladores son cajas, generalmente de polipropileno y/o policarbonato, transparentes, en su parte superior tienen una reja de acero inoxidable y una tapa con filtro. Permiten alojar pocos animales en estudios de corta duración, generalmente no más de tres meses. De esta forma, los animales mantienen su condición sanitaria durante todo el ensayo. Es necesaria una estación de cambio auxiliar o realizar estos procedimientos bajo un flujo laminar. También son muy útiles para transportar animales entre áreas de producción y laboratorios o dentro de una misma Institución.

Lecho o cama para cajas o jaulas

El material del lecho de los animales es un factor del medio ambiente que se puede controlar, e influye directamente en el bienestar animal y por lo tanto, en los resultados experimenta-

les. Se utiliza para absorber, diluir y/o limitar el contacto del animal con sus excrementos y para la construcción de nidos. Proporciona aislamiento, permitiendo que el animal regule su temperatura; puede servir para proporcionar enriquecimiento ambiental; minimiza el crecimiento de microorganismos; y en algunos casos, reduce la acumulación de amoníaco dentro de la jaula. El lecho puede ser con o sin contacto. Por definición, el lecho de contacto es aquel que tiene relación directa con los animales. El lecho sin contacto se proporciona como una sábana o un rollo, y se coloca debajo de una rejilla o de la jaula para recolectar y absorber la orina y las heces, normalmente no entra en contacto físico con el animal.

Se utiliza una gran variedad de materiales, la selección del lecho debe basarse en diversos factores, tales como la preferencia de los animales. Por ejemplo, los ratones muestran predilección por materiales fibrosos, que pueden manipular y les permite construir un nido. Los cerdos buscan y exploran naturalmente, incluso cuando no hay estímulos obvios, por lo que, si se les proporciona un lecho, debe ser de naturaleza tal, que aliente y satisfaga ese comportamiento. En ratones desnudos o sin pelo que carecen de pestañas, las fibras de algunas formas de lecho de celulosa pueden provocar abscesos periorbitarios (Carter R. y col. 2018). Otras consideraciones para la selección de la cama son el costo del producto; disponibilidad; absorción; palatabilidad o falta de ella; facilidad de manipulación, transporte y almacenamiento, incluido el embalaje y el peso del producto (seco y húmedo); la capacidad de esterilizar y/u obtener productos irradiados con rayos gamma; la capacidad de controlar la acumulación de amoníaco; y la cantidad de polvo asociado. No hay un lecho ideal para todas las especies.

Los métodos de fabricación, monitoreo y almacenamiento del lecho por parte de los proveedores son importantes, ya que puede estar contaminado con toxinas y contaminantes ambientales, así como con bacterias, hongos y parásitos (NRC, 2011). El lecho no se debe colocar sobre el piso durante el transporte y almacenamiento sino en tarimas, estantes o carros, de tal manera que se preserve su calidad y se reduzca al mínimo la contaminación. Durante la esterilización en autoclave la cama puede absorber humedad, resultando en una menor capacidad de absorción y favoreciendo el crecimiento de microorganismos; por lo tanto, se deben dar los tiempos de secado y las condiciones de almacenaje apropiadas.

La cantidad de lecho que se coloca en la caja o jaula debe ser suficiente para que los animales se mantengan secos durante el lapso comprendido entre los cambios, y para que el animal pueda expresar su repertorio natural de conductas como excavación, forrajeo, formación de madriguera y nido. En el caso de los pequeños roedores de laboratorio, hay que observar que los picos de los bebederos no toquen el lecho, porque esto causa derrame de agua dentro de la jaula. También debe tener una capacidad de absorción adecuada, ya que, si es muy absorbente, puede provocar la deshidratación de las crías, como sucede en el caso de los roedores y los conejos los cuales nacen sin pelo y muy poco desarrollados. Y por el contrario si son hidrofóbicas, los animales van a estar húmedos, aumentando su estrés y alterando el bienestar.

Tipos de lecho

La cama, generalmente, se fabrica a partir de materiales vegetales como la madera, el algodón y la mazorca de maíz, que están sujetos a diversos grados de procesamiento.

Madera

La viruta de madera blanca es el material de contacto más utilizado, aunque su uso, sin tratamiento, está contraindicado en algunos protocolos, debido a que puede afectar el metabolismo animal (Davey A. K. y col. 2003). No se recomiendan las virutas de cedro porque presentan hidrocarburos aromáticos inductores de las enzimas microsomales hepáticas y además son citotóxicas (Torrönen y col. 1989) y se ha reportado que aumentan la incidencia de cáncer (Jacobs y col. 1978). Para reducir la concentración de hidrocarburos aromáticos y prevenir este problema se ha usado el tratamiento con calor, previo a su utilización. Hay que evitar el uso de viruta de maderas que al mojarse tiñan a los animales, ya que esto provoca peleas; tampoco deben despedir aromas que enmascaren los olores naturales. La más aceptable es la viruta de álamo.

Marlo

El marlo o mazorca de maíz, se produce a partir del centro leñoso de la mazorca. Se procesa en un molino, posteriormente se seca, y está disponible en varios tamaños de granulación. Este material inhibe la acumulación de amoníaco, pero esta característica no está relacionada con su capacidad de absorción. La mazorca de maíz puede ser abrasiva y se ha asociado con lesiones en las patas en cepas de ratones inmunodeprimidos. También se ha observado la liberación de ácido acético en forma de gas, presumiblemente por la descomposición de la materia orgánica residual. La densidad de la mazorca de maíz limita la construcción de nidos y, por lo tanto, se debe complementar con material para la nidificación o mezclar con otros tipos de camas. Se recomienda esterilizar en autoclave o comprarlo irradiado, ya que la porosidad de la mazorca de maíz conduce al crecimiento de moho en el producto no esterilizado o no irradiado. La mazorca de maíz se expande y se adhiere durante el autoclavado, lo que requiere la necesidad de disociar los gránulos después de la esterilización con vapor (Carter R. y col. 2018).

Celulosa

Una variedad de productos de madera procesada, por ejemplo, celulosa tanto virgen como reciclada, se utilizan como lecho de contacto y sin contacto. Los productos difieren en capacidad de absorción, color, forma y tamaño. También se pueden mezclar con otros productos, como el marlo. Los lechos de celulosa son más caros que la madera y generalmente son ideales para la construcción de nidos. Hay una gran variedad de productos fabricados a partir de la celulosa, utilizados como cama sin contacto. Estos incluyen al papel absorbente con respaldo de plástico y al cartón corrugado. Se comercializan en hojas pre cortadas, con forma de bandeja y en rollo. El material utilizado para la cama sin contacto se puede impregnar con antibióti-

cos, por ejemplo, neomicina, para inhibir el crecimiento bacteriano y la posterior producción de amoníaco (Carter R. y col. 2018).

Agua de bebida

Se administra en mamaderas con un pico especial de acero inoxidable. Las botellas de agua siguen siendo la mejor opción para el suministro de agua para los animales de laboratorio. Se fabrican comercialmente en varios tamaños y materiales, tales como el vidrio y distintos polímeros plásticos. Deben ser resistentes a productos químicos desinfectantes y al proceso de esterilización con vapor.

El vidrio se usa desde hace mucho tiempo en la industria, presenta la desventaja de ser pesado en comparación con los polímeros plásticos, y debido a las frecuentes roturas se producen lesiones en el personal. Se ha demostrado que, en determinadas circunstancias, las botellas de vidrio aportan silicio al agua potable, introduciendo una nueva variable en las investigaciones.

Las botellas de tipo polímero ofrecen la ventaja de ser livianas, duraderas, transparentes y resistentes al calor y a la degradación química. Se comercializan en diversos volúmenes y formas, que se adaptan a las distintas especies de animales de laboratorio. Aunque las botellas de polímero ofrecen muchas ventajas, un tipo de polímero plástico, el policarbonato, se ha asociado con la liberación de bisfenol A (Howdeshell K. L. y col. 2003), un compuesto orgánico sintético utilizado en la producción de policarbonatos y otros termoplásticos. El bisfenol A y análogos, bisfenol S y bisfenol F, se caracterizan por ser disruptores endócrinos y exhiben propiedades similares a la de los estrógenos. Por el contrario, el polipropileno, polietileno y tereftalato de polietileno (PET) no se fabrican con bisfenoles u otros disruptores endócrinos conocidos, lo que sugiere que estos materiales representan una alternativa viable. La introducción de disruptores endócrinos a través del suministro de agua, puede agregar una variable a la investigación y quizás perturbar los ciclos normales de reproducción (Allen E. D. y col. 2018).

Los tapones o tapas están disponibles en una amplia gama de materiales. Los tapones de caucho y neopreno negros son los tipos predominantes. De estos dos, el neopreno es más resistente a la degradación causada a los ciclos repetitivos de esterilización con vapor; sin embargo, el endurecimiento de los tapones, ocurre con ambos tipos. Esto puede provocar la descomposición y la liberación de partículas del tapón al agua potable. En última instancia, estas partículas serán consumidas por los animales con consecuencias potencialmente negativas. También se sabe que los tapones de caucho y neopreno liberan minerales y metales pesados al agua (Nunamaker y col. 2013).

Hay que asegurarse que el pico de la mamadera no se tape, ya que la falta de agua luego de dos o tres días puede provocar la muerte del animal. Se recomienda reemplazar las botellas por otras limpias y con agua fresca, antes que rellenarlas, con el fin de evitar contaminaciones

microbiológicas. Cada caja tiene su modelo particular de mamadera. Cuando se deben transportar los animales, el agua se coloca en forma de gelatina consistente, o frutas (manzana, mandarinas, naranjas), o un trozo de papa.

La esterilización con vapor es uno de los métodos más antiguos y eficaces para tratar el agua potable de los animales de laboratorio. En condiciones apropiadas, la esterilización con vapor destruye todos los microorganismos presentes en el medio acuático, incluidos virus, bacterias, esporas, hongos, mohos y protozoos.

El uso de compuestos de cloro para tratar el agua potable de los animales es un medio de desinfección eficaz y aceptable. Estos compuestos preservan la calidad del agua al evitar que microorganismos sensibles al cloro colonicen el sistema de distribución de agua. Incluso tienen efecto antimicrobiano a concentraciones bajas.

Hay muchos compuestos de cloro disponibles para tratar los suministros de agua potable. Las cloraminas, el hipoclorito de sodio (NaOCl) y el dióxido de cloro (ClO₂) se encuentran entre los compuestos más utilizados. En concentraciones correctas, los compuestos de cloro son seguros para el consumo humano y animal (Allen E. D. y col. 2018).

El ácido inorgánico se ha utilizado durante mucho tiempo en los sistemas de agua potable de los animales de laboratorio como medio para controlar la contaminación bacteriana. El agua acidificada ha sido particularmente eficaz para eliminar patógenos oportunistas gramnegativos como *Pseudomonas aeruginosa*, un organismo común que se encuentra en los suministros de agua domésticos. Aunque son eficaces contra *P. aeruginosa* y otras bacterias Gram negativas, algunos microorganismos (por ejemplo, hongos resistentes a los ácidos) pueden no verse afectados y sobrevivir.

El ácido clorhídrico es el más utilizado, aunque el ácido sulfúrico constituye una opción eficaz. Un pH de entre 2,5 y 3,0 es la concentración de ácido recomendada. Se ha demostrado que un pH por debajo de 2,5 afecta las ganancias de peso y el consumo de agua en ratones machos. El uso de agua acidificada puede tener algunos efectos secundarios en la investigación, los cuales deben considerarse antes de su uso. En algunos casos, el agua acidificada puede reaccionar con los tapones de las botellas de agua y liberar sustancias indeseables. También se ha demostrado que altera el microbioma intestinal y la incidencia y la tasa de aparición de la diabetes (Allen E. D. y col. 2018).

Alimento

El suministro de alimentos de alta calidad es esencial para satisfacer las necesidades fisiológicas de los animales, específicamente el crecimiento, el mantenimiento y la reproducción. Existen numerosos productos, que difieren en el contenido de nutrientes, disponibles en varias formulaciones. Una directiva principal al formular piensos es garantizar un contenido suficiente de agua, carbohidratos, grasas (lípidos), proteínas, minerales y vitaminas. Si bien todos los animales requieren cada una de estas seis clases de nutrientes, algunas especies pueden re-

querir niveles más altos de algunos que otros. Se debe tener en cuenta que los nutrientes esenciales son aquellos que un animal no puede sintetizar o no sintetiza en cantidades suficientes para mantenerse sanos, por lo que deben obtenerse de una fuente externa, es decir, en la dieta. Es importante reconocer, al seleccionar una dieta, que un nutriente en particular puede ser esencial (es decir, necesario en la dieta o proporcionado de otra manera) para algunas especies, pero no para otras. Los nutrientes no esenciales son aquellos que son producidos por el animal o su flora microbiana (Carter R. y col. 2018).

Debe ser palatable y digestible. Libre de harina de pescado, aditivos, drogas, hormonas, antibióticos, pesticidas y contaminantes; todos estos agregados interfieren en los resultados de las pruebas. En roedores se administra *ad libitum*. Se debe conocer su composición, fecha de elaboración y fecha de vencimiento. Lo ideal es consumirlo antes de cumplirse los 3 meses de su producción. Las bolsas deben estar intactas durante su almacenamiento, sin roturas ni mofaduras o humedad. No deben almacenarse sobre el piso directamente y debe controlarse el ingreso de roedores salvajes u otros vectores de enfermedades al depósito de alimento. El alimento puede ser irradiado (radiación γ) y reforzado con un antioxidante para evitar que se enrancie. O puede ser esterilizado en autoclave y reforzado con vitaminas, ya que algunas se degradan con el calor. También el autoclavado puede afectar la palatabilidad y dureza de los pellets. En cada sala, se suele tener un contenedor con una pequeña reserva de alimento: se recomienda no intercambiar esos recipientes entre salas ni trasladarlos por los pasillos para evitar contaminaciones.

Y lo ideal es tener un certificado con el análisis químico y microbiológico de cada lote o partida. Debe cuidarse al máximo sus condiciones de transporte, de almacenamiento, la manipulación y el tratamiento que se le da antes de aportárselo a los animales. El alimento en forma de pellets debe tener la consistencia adecuada para que el animal pueda consumirlo y que no se desperdicie.

Densidad animal

Es el número de animales por caja o jaula. Debe responder a las recomendaciones internacionales. La cantidad de animales a colocar en una caja o jaula depende de su tamaño corporal, edad, estado pre y post natal, evitando el hacinamiento. Cada animal debe disponer de un espacio mínimo, suficiente para moverse y expresar las posturas normales de conducta y sociabilidad. Debe tener fácil acceso al agua y alimento y disponer de un área suficiente con lecho limpio y sin obstáculos para moverse y descansar (**Tabla 1**).

Animales	Peso corporal (g)	Área de piso/Animal cm²	Altura^a cm
Ratones	< 10	38,71	12,7
	Hasta 15	51,61	12,7
	Hasta 25	77,42	12,7
	> 25 ^b	96,77	12,7
Ratas	< 100	109,68	17,78
	Hasta 200	148,39	17,78
	Hasta 300	187,1	17,78
	Hasta 400	258,1	17,78
	Hasta 500	387,1	17,78
	> 500 ^b	451,61	17,78
Hámsteres	< 60	64,52	15,24
	Hasta 80	83,87	15,24
	Hasta 100	103,23	15,24
	> 100 ^b	122,58	15,24
Cobayos	≤ 350	387,1	17,78
	> 350 ^b	651,6	17,78
a. De piso a techo de la jaula. b Los animales más grandes pueden requerir más espacio para satisfacer los estándares de rendimiento (vea el texto)			

Tabla 1. Espacio recomendado para roedores de laboratorio alojados en grupo.
Fuente: *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Research Council.*

Macroambiente

Es el ambiente físico o espacio secundario que contiene el conjunto de cajas, jaulas, corrales, gátiles o caniles.

Los factores que componen el macroambiente son: la temperatura, la humedad, la iluminación, la ventilación, los ruidos y los olores. La alteración de estos factores producirá cambios en el modelo animal y con ello, la modificación del tipo de respuesta, y aumento de la variabilidad de los resultados entre o dentro de los laboratorios de experimentación.

Temperatura y humedad

Estos parámetros deben fluctuar dentro de un rango estrecho, de acuerdo con la especie y la cepa. Por ejemplo, para ratones la temperatura adecuada es entre 20 a 25°C y la humedad entre 40 y 70 %. El mantenimiento de la temperatura corporal dentro de los límites de la variación normal es esencial para el bienestar de los homeotermos. Generalmente la exposición de los animales no adaptados a temperaturas superiores a los 29.4°C o por debajo de 4.4°C, sin que tengan acceso a protección en un refugio u otro mecanismo, producen efectos clínicos, que pueden poner en peligro su vida. Los animales se pueden adaptar a condiciones extremas mediante mecanismos morfológicos, fisiológicos y de conducta, pero tales adaptaciones llevan tiempo y pueden alterar los resultados experimentales o afectar los rendimientos (CCAC, 2003).

Los cambios de temperatura producen cambios en el metabolismo, en la circulación periférica, en la actividad y comportamiento de los animales. Al producirse variaciones en la ingesta, se producen cambios en las pruebas de captación de sustancias, así como en la actividad de esas sustancias. Además, interfieren en la lactancia, gestación y espermatogénesis. En general, los roedores soportan mejor las bajas temperaturas que las altas, por encima de los 32°C puede producirles la muerte. Esto se debe a que los roedores tienen mayor dificultad para disipar el calor, puesto que carecen de glándulas sudoríparas, no jadean y tienen casi toda su superficie corporal cubierta de pelos. Disipan el calor a través de la cola, mojan su cuerpo con saliva, y en la naturaleza cavan pozos. Las ratas cuando se encuentran en ambientes fríos producen menor cantidad de ácido ascórbico, por lo que se aconseja suministrarles vitamina C (Salvador Cabos N. 2001).

La temperatura de la sala también puede variar de acuerdo a la densidad animal, equipos que estén en funcionamiento y por la cantidad de personas y el tiempo que ellas se encuentren trabajando en la sala.

La humedad relativa (HR) es otro componente del macroambiente que podría tener efectos perjudiciales sobre la salud animal si no se mantiene dentro de rangos tolerables. Si bien existe un rango más amplio de control de la humedad (30% -70%) que la temperatura, se deben evitar las variaciones extremas (NRC 2011). Estos valores se basan en rangos tolerables para la mayoría de las especies de mamíferos, es fundamental determinar cuál es el rango ideal para la especie utilizada en la investigación biomédica. Se ha demostrado que las fluctuaciones extremas impiden la tasa de pérdida de calor de un animal, afectan la actividad normal y provocan cambios en las cantidades normales de ingesta de alimentos (NRC 2011). Ciertas especies pueden desarrollar dermatitis o piel escamosa, y las ratas y ratones pueden desarrollar cola anillada o *ring-tail*, por períodos prolongados de exposición a humedad por debajo del 30%. La HR extremadamente alta también puede influir en las condiciones del microambiente, como el aumento de los niveles de humedad en la cama, la condensación de la pared de la jaula, las temperaturas más altas de la jaula, el deterioro de los alimentos y la generación bacteriana de

amoníaco, esto último puede ser responsable de procesos patológicos del tracto respiratorio (Salvador Cabos N. 2001).

Teniendo en cuenta las derivaciones ocasionadas por la falta de control del ambiente, la temperatura y la humedad deben monitorearse y registrarse de manera regular. Un equipo tan simple como un higrotermómetro en cada sala o un sofisticado sistema electrónico de monitoreo ambiental en toda la instalación puede garantizar que los animales no estén sujetos a períodos prolongados de fluctuaciones extremas de temperatura y humedad (Hogan M. C. 2018).

Ventilación y calidad del aire

Este factor es fundamental ya que además de aportar el oxígeno necesario, elimina la carga térmica producto de la respiración animal, la iluminación y los aparatos; diluye los gases y partículas contaminantes; ajusta el contenido de humedad del aire de la sala; y en donde sea necesario crea diferencia de presión de aire entre espacios adyacentes. Sin embargo, el establecer un índice de ventilación en el cuarto no asegura la adecuación de la ventilación en el encierro primario del animal y por lo tanto no garantiza la calidad del microambiente.

El grado de movimiento del aire o corriente de aire causa incomodidad y consecuencias biológicas. El volumen y las características físicas del aire suministrado a un cuarto y su patrón de difusión, influyen en la ventilación del microambiente del animal. El tipo y la localización de los difusores del suministro de aire, las ventanillas de salida del mismo, afecta la eficiencia de la ventilación del encierro primario (caja o jaula) y secundario (sala). Para evaluar estos factores, en relación con la carga de calor y los patrones de difusión del aire y lograr una óptima ventilación tanto del encierro primario como en la sala, son de gran utilidad los modelos de computadora.

Durante muchos años se ha usado la recomendación de 10 a 15 cambios por hora del volumen total de aire del encierro secundario y aún se considera un estándar general aceptable. Aun cuando es eficaz para muchas situaciones encontradas en los bioterios, esta recomendación no toma en cuenta el rango de las posibles cargas térmicas; las especies, tamaño y número de animales en cuestión; el tipo de lecho o la frecuencia de su cambio; las dimensiones del cuarto; o la eficiencia de la distribución del aire del encierro secundario hacia el primario. El uso de una recomendación tan amplia puede, en algunas situaciones, causar problemas al sobreventilar un encierro secundario que contenga muy pocos animales y por lo tanto desperdiciar energía, o bien subventilar otro encierro secundario en donde haya muchos animales y por lo tanto se acumulen los olores y el calor. Para determinar con mayor precisión la ventilación requerida se puede calcular, con la ayuda de un ingeniero mecánico, el índice de ventilación mínima (en metros cúbicos por minuto) necesario para acomodar las cargas de calor generadas por los animales. El calor generado por los animales se puede calcular con la fórmula de ganancia-promedio-del-calor-total publicada por la *American Society of Heating, Refrigeration and*

Air-Conditioning Engineers (ASHRAE, 1992). Esta fórmula es independiente de la especie y en consecuencia aplicable a cualquier animal que genere calor. La ventilación mínima requerida se obtiene calculando la cantidad de enfriamiento necesaria (carga de enfriamiento total) para controlar la carga de calor que se espera será generada por el número máximo de animales que pueden ser hospedados en el encierro problema, más cualquier otro calor generado de fuentes no animales y transferido a través de las superficies del cuarto. El método de cálculo de la carga total de enfriamiento también se puede usar en espacios para animales que tengan un índice de ventilación fijo y determinar el número máximo de animales (con base en la masa animal total) que pueden alojarse en ese espacio. Si bien este cálculo se puede usar para determinar la ventilación mínima necesaria para evitar la acumulación de calor, otros factores tales como: el control del olor, de alérgenos, la generación de partículas y el control de los gases producto del metabolismo, podrían demandar una ventilación mayor que el mínimo calculado (NRC 2011).

Se debe tener en cuenta que la calidad del aire en las habitaciones no solo tiene un impacto en la salud animal, sino que también es un componente importante para crear un entorno seguro para el personal que trabaja en las instalaciones para animales. Uno de los riesgos laborales más comunes para el personal que trabaja en los bioterios, es el desarrollo de alergias relacionadas con los animales o una mayor sensibilidad a los alérgenos. La calidad del aire de la habitación de los animales se ve afectada por la carga de partículas de una variedad de partículas, como la caspa de los animales y el polvo generado por la cama de los animales, por gases como los vapores de amoníaco y por agentes infecciosos tanto de animales como de seres humanos (Hogan M. C. 2018).

Iluminación

La iluminación adecuada es crucial para la fisiología y el comportamiento de un animal, y las alteraciones en el ciclo, la intensidad o el espectro de la luz pueden provocar estrés. Además de la duración, la intensidad y la longitud de onda, las especies y la cepa de los animales también son factores a considerar (NRC 2011) para el macroambiente.

La iluminación debe ser uniforme en todo el macroambiente para satisfacer los requisitos de iluminación específicos del animal y proporcionar suficiente luz para realizar los procedimientos de evaluación de la cría, la higiene y la salud animal. La iluminación debe estar en niveles apropiados independientemente de la ubicación del animal en la habitación. Para la mayoría de los bioterios la recomendación es de 325 lux aproximadamente a 1 m sobre el piso para las salas de animales, sin causar daño a la retina a los roedores albinos (NRC 2011).

Para controlar la intensidad de la luz y proporcionar la iluminación adecuada, la mayoría de las instalaciones modernas, están diseñadas para incluir sistemas de iluminación de dos niveles. Con este sistema, se puede establecer un nivel bajo de lux para los roedores albinos o en niveles más altos para animales con ojos normalmente pigmentados. La iluminación también se

puede ajustar de acuerdo con las necesidades del investigador o adaptarse a actividades de cría. Los bioterios más modernos utilizan sistemas computarizados para controlar la iluminación de dos niveles, los cuales pueden administrarse desde el escritorio o mediante acceso remoto a través de aplicaciones en dispositivos móviles (Hogan M. C. 2018).

Las instalaciones están diseñadas para proporcionar un entorno de luz controlada que evite que las influencias ambientales externas, como la iluminación natural, creando variaciones de los fotoperíodos programados. Los ciclos de luz deben garantizar que la salud animal no se vea comprometida y deben brindar ritmos diurnos y circadianos normales. Los ciclos de luz que proporcionan de 12 a 14 horas de luz al día son apropiados para la mayoría de los animales de laboratorio (Pritchett-Corning y col. 2011).

Dado que la mayor parte de la actividad humana en una instalación de investigación ocurre normalmente durante el día, el fotoperiodo más utilizado en las instalaciones de investigación animal es la iluminación durante el día y la oscuridad durante la noche. Durante este ciclo, las luces de la sala de los animales están encendidas durante el horario de trabajo normal del animalario y a un nivel de iluminación aceptable para permitir la cría de rutina, el cuidado veterinario y las actividades de investigación. Sin embargo, en algunas situaciones, los investigadores eligen ciclos de luz invertida, donde las luces están apagadas durante el día y encendidas durante la noche. Dado que los roedores son animales de hábitos nocturnos, este tipo de fotoperiodo es conveniente para que los investigadores observen las actividades y el comportamiento de estos animales. La iluminación de espectro rojo y los anteojos de visión nocturna pueden aliviar algunos de los desafíos permitiendo que el personal continúe con seguridad con sus actividades diarias. La iluminación del espectro rojo funciona debido a una diferencia en las células que forman la retina del ojo humano y del roedor (Pritchett-Corning y col. 2011). Los roedores no pueden percibir la luz roja, mientras que los humanos pueden ver esta longitud de onda de luz, lo cual permite continuar las operaciones diarias en el ambiente iluminado esta luz. Aunque la iluminación del espectro rojo es ampliamente reconocida por permitir un entorno de trabajo seguro para los seres humanos, un estudio reciente mostró evidencia de cambios marcados en los ritmos hormonales circadianos y corticosterona plasmática en ratas desnudas que estaban alojadas en jaulas teñidas de rojo. Como alternativa al uso de iluminación de espectro rojo, Faith y Huerkamp describieron los beneficios de las lámparas de sodio (vapor), que proporcionan niveles de luz suficientes para los humanos, pero atenúan la luz para los roedores a un nivel que permite el comportamiento nocturno (Faith y Huerkamp 2009).

Los sistemas de iluminación electrónicos más avanzados, son capaces de cambiar gradualmente la intensidad de lux, creando un efecto de anochecer a amanecer en lugar de un cambio brusco en la iluminación. Los cambios repentinos en la intensidad de la iluminación pueden provocar una respuesta de sobresalto en los animales. Por ejemplo, las aves que no están acostumbradas a fotoperíodos programados pueden volar y chocar con paredes u otros obstáculos cuando inesperadamente se apaga la luz. Algunas especies acuáticas requieren

iluminación de transición para estimular los comportamientos de alimentación, limpieza y comodidad (Hogan M. C. 2018).

Se sabe, que los ciclos de luz son muy importantes para mantener el ritmo circadiano natural, y que sus alteraciones pueden tener efectos perjudiciales en el cerebro, la función corporal y el comportamiento. Se observó que los ratones sometidos a un fotoperiodo de 20 horas (10 horas de luz y 10 horas de oscuridad) durante 6 a 8 semanas, mostraron cambios profundos en la cognición y la fisiología, aumento de la temperatura corporal, alteración de los niveles hormonales normales y aumento de peso. Otros estudios han demostrado que los cambios en el fotoperiodo produjeron alteraciones del comportamiento (aumento de la agresividad), así como cambios en la reproducción y una mayor susceptibilidad al cáncer y a enfermedades infecciosas. Dado que las interrupciones no programadas en los fotoperíodos pueden ser devastadoras para los resultados de la investigación, la iluminación debe controlarse electrónicamente y monitorearse regularmente para garantizar que los ciclos sean constantes (Hogan M. C. 2018).

Históricamente, se utilizan tubos de luz fluorescente, tipo luz de día, en el techo de los pasillos y en las salas de los animales. Lo más moderno es la introducción de diodos emisores de luz (LED), que, a niveles apropiados, demostraron que no interfieren con los ritmos circadianos ni causan efectos fototóxicos. Estas luces se colocan en las cuatro esquinas de las salas, para que todas las cajas reciban la misma cantidad de luz. Aunque la iluminación LED suele ser más cara al principio, consume menos energía y funciona durante más tiempo que las luminarias tradicionales. Otra opción, es el aumento de la iluminación natural a través de ventanas o tragaluces. Aunque no es recomendable, debido a la incapacidad de controlar estrictamente los fotoperíodos, puede ser parte de un programa de enriquecimiento ambiental para especies de nivel superior, como primates no humanos o animales de granja alojados en instalaciones de investigación (Hogan M. C. 2018).

Ruidos

Se ha demostrado que el ruido y la vibración afectan muchos parámetros de comportamiento y fisiológicos en animales y pueden ser una variable de confusión en estudios de investigación. Por lo tanto, deben evitarse, sobre todo los repentinos y estridentes. No utilizar sirenas ni alarmas. El aislamiento de los ruidos y las vibraciones debe considerarse desde el diseño de las instalaciones. El máximo nivel permitido es de 50 decibeles, si es mayor puede tener un efecto nocivo provocando estrés y problemas de fertilidad. Los roedores son muy sensibles a los ultrasonidos, pueden oír frecuencias mayores a 80 KHz. En general los sonidos constantes y de baja frecuencia son menos nocivos que los sonidos intermitentes y de alta frecuencia. Además de la intensidad, influye también la duración, el tiempo de exposición, la repetición, así como la especie y el estado fisiológico del animal expuesto. Los animales sometidos a determinados sonidos pueden presentar daños en los oídos, hipertensión, cambios en su peso corpo-

ral, en la respuesta inmune, en la química sanguínea, además de provocar canibalismo (Salvador Cabos N. 2001).

Es recomendable que las áreas donde se alojan los animales, estén bien separadas de las oficinas o sectores donde trabaja el personal, para reducir al mínimo las molestias a ambos ocupantes de las instalaciones. Los animales ruidosos, como los perros, cerdos, caprinos, y primates no-humanos deben alojarse lejos de los animales silenciosos como los roedores, conejos y gatos (ILAR 1999).

Olores

El olor es otro factor que afecta a los animales de experimentación, es por ello que no se debe utilizar desinfectantes que emanen olores, que sean irritantes y mucho menos desodorizantes, dentro de los ambientes del bioterio. Evitar todo tipo de perfume que enmascare los olores naturales de los animales, ya que pueden producir cambios en la conducta social.

La percepción de amoníaco en el ambiente es un indicador de saturación del lecho, por lo que se recomienda tener programas de cambio de lecho según la población que se maneje. Por ejemplo, se conoce que el hombre es capaz de percibir 100 ppm de amoníaco del ambiente del ratón y éste puede percibir desde 25 ppm.

Es fundamental también cuando nos referimos al macro y microambiente contar con un buen programa de enriquecimiento ambiental para asegurarnos el bienestar de los animales que se encuentran confinados y que serán utilizados en las distintas experiencias. Los elementos de enriquecimiento deben ser descartables o lavables y autoclavables, no tóxicos, no peligrosos ni estresantes *per se*.

Un buen manejo de todos estos factores nos permitirá mantener y producir animales de laboratorio definidos respetando los estándares internacionales.

Referencias

- Allen E.D., Czarra E.F., DeTolla L. Water Quality and Water Delivery Systems. Weichbrod RH, Thompson GAH, Norton JN, eds. *Management of Animal Care and Use Programs in Research, Education, and Testing. 2nd edition*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2018. Chapter 28. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500450/#> doi: 10.1201/9781315152189-28
- ASHRAE (American Society of Heating, Refrigeration, and Air Conditioning Engineers, Inc.) (1992) Chapter 25: Air cleaners for particulate contaminants. *ASHRAE Handbook, 1-P edition*. Atlanta: ASHRAE.

- Carter R.L. y Lipman N. S. (2018). Feed and Bedding. Weichbrod RH, Thompson GAH, Norton JN, eds. *Management of Animal Care and Use Programs in Research, Education, and Testing. 2nd edition*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis. Chapter 27. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500447/> doi: 10.1201/9781315152189-27
- CCAC (Canadian Council on Animal Care) (2003) *Guidelines on: laboratory animal facilities, characteristics, design and development*. p. 13.
- Davey A. K., Fawcett J. P., Lee S. E., Chan K. K., Schofield J.C., 2003. Decrease in hepatic drug-metabolizing enzyme activities after removal of rats from pine bedding. *Comp. Med.* 53 (3): 299-302.
- Faith, R.F. y Huerkamp M. J. (2009). Environmental considerations for research animals. *Planning and Designing Research Animal Facilities*. eds. Hessler J.R. y Lehner N. D. M. 59–83. San Diego: Elsevier.
- Hogan M.C., Norton J.N., Reynolds R. P. Environmental Factors: Macroenvironment versus Microenvironment. Weichbrod R. H., Thompson G. A. H., Norton J.N. Eds. *Management of Animal Care and Use Programs in Research, Education, and Testing. 2nd edition*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2018. Chapter 20. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500431/> doi: 10.1201/9781315152189-20
- Howdeshell, K. L., Peterman P. H., Judy B.M., Taylor J. A., Orazio C. E., Ruhlen R. L., Vom Saal F. S. y Welshons W. V. (2003). Bisphenol A is released from used polycarbonate animal cages into water at room temperature. *Environ. Health. Perspect.* 111(9): 1180-1187.
- ILAR (Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences) Medio ambiente, alojamiento y manejo de los animales. *Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio*. Edición Mexicana auspiciada por la Academia Nacional De Medicina. 1999. Copyright National Academy Press, Washington, D.C. 1996
- INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) (2010) *Guía para cuidado y uso de animales de experimentación*. p. 13-14.
- Jacobs, B. B. y Dieter D. K. (1978). Spontaneous hepatomas in mice inbred from Ha:ICR swiss stock: Effects of sex, cedar shavings in bedding, and immunization with fetal liver or hepatoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 61(6):1531-1534.
- NRC (National Research Council) (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington, DC: National Academy of Sciences.
- Nunamaker E.A., Otto K. J., Artwohl J.E. y Fortman J.D. (2013). Leaching of heavy metals from water bottle components into the drinking water of rodents. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 52 (1): 22–27.
- Ortman, J. A., J. Sahenk, and J. R. Mendell. 1983. The experimental production of Renault bodies. *J. Neurol. Sci.* 62: 233-241.
- Pritchett-Corning, K.R., Chou S. T, Conour L. A., y Elder B. J. (2011). Biology and reproductive biology. *Guidebook on Mouse and Rat Colony Management*. 14–44. Wilmington, MA: Charles River Laboratories.

Salvador Cabos N. (2001) Biología general del reactivo biológico. Jesús Zúñiga, Ramón Piñeiro González, Silvana Milocco y Josep Tur Marí (Eds.) *Libro Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal* (23-81). Madrid McGraw-Hill Interamericana.

Torronen, R., Pelkonen K., y Karenlampi S. (1989). Enzyme-inducing and cytotoxic effects of wood-based materials used as bedding for laboratory animals. Comparison by a cell culture study. *Life Sci.* 45:559-565.