

CAPÍTULO 21

Analgesia, anestesia y eutanasia en animales de experimentación

María Clara Vercellini y Guido Mariano Príncipi

Introducción

Los procedimientos experimentales y de producción de animales de laboratorio requieren de personal responsable e idóneo en el manejo de las especies utilizadas.

El uso de técnicas anestésicas seguras y efectivas puede tener una gran influencia sobre el bienestar de los animales del laboratorio. La mejora de estas técnicas debería considerarse un aspecto esencial del perfeccionamiento de los métodos experimentales recomendados por Russell y Burch (Flecknell, 1998).

En esta línea resulta esencial el reconocimiento del dolor del animal de experimentación, que en casos de presentarse deberá ser abolido, reducido al mínimo (Flecknell, 1998) incluso optar por el sacrificio de los animales no exista tratamiento adecuado para evitar el sufrimiento.

En el presente capítulo, revisaremos los principales métodos de anestesia, analgesia y eutanasia en animales de experimentación, Estos métodos son objeto de estudio y evaluación constante, y en ese sentido van evolucionando a través de los años y presentan alternativas para adecuarse a las particularidades cada especie y del protocolo experimental.

Reconocimiento del dolor

El dolor es definido como una experiencia sensorial y emocional no placentera asociada con el daño potencial tisular (Kohn, 2007)

Esto se puede observar claramente en cualquier especie de vertebrados, incluso en invertebrados como cefalópodos, ya que poseen a un sistema nervioso muy desarrollado (Lewbart, 2010)

Se diferencia al dolor de la *nocicepción* que es la capacidad para responder a estímulos sensoriales aversivos (Botana, 2002) presente en numerosas especies invertebradas como esponjas, anélidos, gasterópodos, crustáceos, etc. (Lewbart, 2010).

Para muchos investigadores resulta difícil interpretar el dolor en los animales ya que estos pueden no manifestarlo o expresarlo del modo esperado. Por ejemplo, muchas especies de laboratorio demuestran inmovilidad frente a estímulos dolorosos generando la falsa idea de que, por estar quietos, no sufren. Los roedores vocalizan a escalas ultrasónicas, y solamente emitirán un sonido audible para el oído humano frente a un dolor o estrés intenso (Zuñiga, 2008).

Generalmente en animales vertebrados, los signos clínicos considerados útiles para valorar el dolor incluyen: cambios en la actividad, aspecto, temperamento que puede alternar entre la agresividad y la apatía. Alteraciones en la ingesta de alimentos o de bebida (normalmente disminuye), cambios fisiológicos como aumento de frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, temperatura y presión arterial. Es común observar vocalización, rascado y lamido de la zona dolorosa (perros y gatos).

También pueden determinarse alteraciones en los parámetros bioquímicos (liberación de catecolaminas, cortisol, sustancia P y prostaglandinas en sangre).

Otras características pueden ser, la inmovilidad o posturas anormales, como la postura xifóptica; presencia de pelo hirsuto, secreción de porfirinas alrededor de los ojos (en el caso de las ratas), y cambio en las *fascias*, son signos típicos de dolor en roedores (Zuñiga, 2008).

A diferencia de lo que ocurre con los vertebrados, el reconocimiento del dolor en invertebrados se vuelve más confuso y se presta al debate. Por un lado, un desarrollo limitado de sus sistemas nerviosos plantea la cuestión de si los invertebrados sienten dolor o experimentan incomodidad. Sin embargo, es sabido que pueden responder a estímulos nocivos. En ese caso, será preciso otorgarles el beneficio de la duda y un tratamiento humanitario hasta se demuestre lo contrario (Lewbart, 2010)

De cualquier forma, conocer la biología y el comportamiento de la especie tratada es fundamental para aplicar un correcto manejo del dolor.

Criterios de selección de agentes anestésicos y analgésicos

Los factores a considerar a la hora de seleccionar las drogas dependen del modelo animal y tipo de paciente. Esto significa conocer la biología de la especie con la que estamos trabajando y si se trata de un paciente geriátrico, pediátrico o bien, con una patología de base. Otros criterios son el tipo de fármaco y sus interacciones, así como la vía de administración, la experiencia del personal veterinario, los recursos y equipos disponibles, la seguridad, el costo y la disponibilidad de la/s droga/s (Zuñiga, 2008).

Es necesario tener en cuenta las variaciones individuales o entre cepas (en el caso de ratas y ratones) o razas en otras especies, más allá de la información sobre dosis o concentraciones sugeridas en la bibliografía por lo que se recomienda hacer uso de grupos pilotos antes de tratar a toda la colonia o grupo.

Hay que tener en cuenta que no se puede realizar extrapolaciones de dosis o concentraciones de fármacos entre diferentes especies. Por ejemplo, los animales de pequeño tamaño como los roedores, poseen un metabolismo más alto que los animales de mayor tamaño, por lo que las dosis a utilizar deben ser muy superiores. Sin embargo, al poseer un peso inferior siempre será necesario preparar diluciones ya que las presentaciones comerciales se ajustan en mg/Kg.

Por esta razón, el veterinario debe estar familiarizado con la biología del animal y actualizarse con la bibliografía específica. En casos de especies en las no exista información disponible o de difícil acceso, realizar interconsultas a especialistas del tema puede resultar una herramienta sumamente útil.

Analgesia

Se define como la ausencia de dolor (Botana, 2002). Reúne los procedimientos encaminados a suprimir la sensación dolorosa. Se aplica a procedimientos quirúrgicos, postquirúrgicos o terapias no invasivas que puedan resultar dolorosas.

La analgesia también está indicada como premedicación anestésica, durante el acto quirúrgico y posterior. Para el manejo de dolor posquirúrgico poco doloroso se recomienda su aplicación durante unas 12hs. En procedimientos más invasivos se recomienda aplicar durante 48-72hs o más, posteriores a la intervención. En estos casos, se debe realizar previa a la recuperación del paciente, antes que los animales experimenten dolor (unos 15-30 minutos antes de que se recupere de la anestesia) esto se conoce como analgesia preventiva. De lo contrario, se produce una hipersensibilización, la cual repercute en el ajuste de la dosis.

Los criterios para selección de la droga analgésica y sus combinaciones denominada analgesia multimodal para lograr una anestesia equilibrada (Botana, 2002) estarán relacionados con la duración del efecto, el tipo de injuria tisular, la especie, edad, estado del paciente, los cuidados postquirúrgicos, entrenamiento del personal y costo de la droga. Por ejemplo, en invertebrados se desconocen drogas analgésicas, mientras que en perros y gatos el uso de ANEs debe estar controlado.

Vías de inoculación

Normalmente los agentes analgésicos se aplican vía parenteral intravenosa (IV), subcutánea (SC) o intraperitoneal (IP). En pacientes de mayor tamaño se recomienda IV, mientras que en roedores es común la analgesia SC e IP. En su uso posquirúrgico, además es común usar la vía oral a través del agua de bebida, así como la vía tópica o la infiltración sobre la herida. En aves, no se debe administrar anestésicos locales como analgesia por resultar tóxicos

(Meredith, 2013 & Aguilar, 2010). Y en peces, la vía más común es colocando el anestésico en el agua, mediante la técnica de inmersión (Brown, 2000).

Drogas para uso analgésico:

Opioides

Son potentes analgésicos. Actúan sobre centro respiratorio y cardíaco produciendo su depresión (bradicardia e hipotensión) de forma moderada. Poseen actividad antitusígena. Producen estreñimiento ya que disminuyen el peristaltismo. Aumentan o disminuyen la actividad locomotora dependiendo de la especie (en el humano disminuye mientras que, en el equino, aumenta). Alteran la producción de corticoesteroides en ratas (Botana, 2002).

Se clasifican en:

- *agonistas mu*: inhiben el dolor visceral y térmico. Son buenos para el dolor agudo y crónico. Inducen euforia. Ejemplo: morfina, metadona, oximorfona, fentanilo, alfentanilo, sufentanilo, remifentanilo, etc.
- *agonistas Kappa*: para tratamiento del dolor visceral. Inducen disforia. Ejemplo: butorfanol, nalbufina
- *agonistas parciales, agonistas antagonistas mixtos* Menos potentes que los agonistas puros. Ejemplo: pentazocine
- *Antagonistas*: revierten los efectos de los agonistas puros y mixtos. Ejemplo: naloxona
- Sintéticos: tramadol

Antiinflamatorios no esteroides (AINEs)

Son analgésicos de potencia moderada para cubrir el dolor postoperatorio, dolores crónicos moderados, o procesos inflamatorios que causan dolor o malestar. Inhiben la enzima ciclooxigenasa, bloqueando la síntesis de prostaglandinas. Pueden ser tóxicos a nivel renal, tracto gastrointestinal, y hemático. Inducen vómito, diarrea, insuficiencia renal y trastornos de coagulación. Por lo que la dosificación crónica debe ser controlada, especialmente en gatos y perros (ya que presentan dificultad para eliminar estas sustancias). De menor toxicidad, son carprofeno y meloxicam. Otros ejemplos: aspirina, paracetamol, ibuprofeno, fenilbutazona, flunixin, etc. (Zuñiga, 2008)

Agonistas adrenérgicos

Agentes analgésicos, sedantes y relajantes musculares (Botana, 2002). Con efecto emético en gatos y perros (no contrasta el efecto de la acepromacina). Deprime el centro termorregulador, hipotensores, bradicardia, depresión respiratoria (en altas dosis). Se utiliza principalmente para la premedicación anestésica. Ejemplo: xilacina, medetomidina.

Anestesia

Es un estado de insensibilidad reversible y controlada producido por fármacos, caracterizado por ausencia de cualquier tipo de percepción sensitiva y respuesta motora (Flecknell, 1998).

Los objetivos de la anestesia son:

- Facilitar la manipulación del animal. Realizar procedimientos quirúrgicos
- Proporcionar trato humanitario a los animales.
- Reducir factores negativos de la cirugía.
- Realizar investigaciones que no se podrían realizar con animales conscientes

Etapas de la anestesia

Preanestesia

En la práctica, no es común solicitar un prequirúrgico en especies como roedores, lagomorfos, peces e invertebrados (Zuñiga, 2008). Sin embargo, la evaluación del estado general del paciente, acompañado de una buena anamnesis o registro de la colonia, resultarán muy útiles al momento de contemplar la anestesia.

En la preanestesia, se pueden diferenciar dos situaciones: a) preparación del paciente, conocido como prequirúrgico y, b) premedicación (Botana, 2002).

- Preparación del paciente: Son todos los procedimientos que se le realizan al paciente para mejorar sus condiciones al momento de enfrentarse a la cirugía y valorar su riesgo anestésico (Botana, 2002). Estas medidas contemplan la anamnesis, el examen clínico y de laboratorio, restricción de agua y alimento durante 8 a 12hs para caninos y felinos; en rumiantes de unas 24 a 48hs. En aves y neonatos, se recomienda ayuno de pocas horas o ninguno ya que entran rápidamente en hipoglucemia. No es necesario en roedores, conejos y peces de pequeño tamaño. Se puede hacer fluidoterapia en caso que se requiera. A partir de esto, se va a clasificar al paciente I, II, III, IV, V, según el riesgo anestésico.
- Premedicación: dirigida a facilitar manejo y la seguridad de la anestesista (Botana, 2002). Permite reducir la excitación, obtener una anestesia basal con inducción más segura y suave, y reducir la dosis. Así como controlar los reflejos autónomos indeseables (anestesia equilibrada). Algunas de las drogas que se pueden utilizar en esta etapa son:
- Tranquilizantes mayores: neurolépticos. Fenotiacinas y Butirofenonas: Producen tranquilización, no son analgésicos. Producen relajación sin sedación, y son antieméticos. No recomendado su uso en hembras reproductoras o lactantes. Entre los efectos adversos se mencionan hipotensión, estreñimiento, retención urinaria, aumentan la pre-

sión intraocular, hiperglucemia, reducen la temperatura corporal. Ejemplos: Acepromacina, droperidol.

- Tranquilizantes menores: benzodicepinas (ansiolíticos): No son analgésicos. Son hipnóticos, sedantes, ansiolíticos, antiepilépticos y relajantes musculares. Ejemplos diazepam, midazolam.
- Parasimpáticos: Evitan efectos indeseables autónomos. Reducen la secreción bronquial y salival. Ejercen el control de la vasodilatación, broncoconstricción y arritmias. Ejemplo: atropina y glicopirrolato.
- Todas las drogas utilizadas para la analgesia.

Anestesia

Un protocolo anestésico ideal debe inducir hipnosis o sueño, un grado apropiado de analgesia intra-operatoria (Flecnell, 1998, p.15), relajación muscular, bloqueo de la actividad refleja, no deben afectar funciones orgánicas, debe ser de fácil administración con acción reversible. De bajo costo y seguro (Zuñiga, 2008). De acuerdo a cada caso se optará por el empleo de anestesia fija o anestesia inhalatoria.

La anestesia propiamente dicha consta de tres etapas:

- Inducción: donde se abolen los reflejos defensivos o se reducen significativamente. Permite la intubación endotraqueal.
- Mantenimiento: los agentes anestésicos deprimen inicialmente la corteza cerebral, luego mesencéfalo, bulbo y, médula finalmente. Las etapas de la anestesia van desde un grado I a IV, pasando desde una etapa excitatoria y consciente, que se va profundizando hacia la II con inconsciencia, hasta alcanzar la etapa III quirúrgica deseada. La etapa IV es indeseada, se caracteriza por una depresión profunda con inminente paro cardiorrespiratorio y muerte, si no se realizan los procedimientos de emergencia adecuados.
- Recuperación

Tipos de anestésicos

Anestésicos locales

Se aplican en forma tópica, por infiltración dérmica o SC, por inyección perineural periférica, paravertebral, epidural o subaracnoidea, y endovenosa (Botana, 2002). Ejemplo: lidocaína. Van a lograr la insensibilidad y analgesia de áreas delimitadas de piel y mucosas, relajación muscular esquelética.

Anestésicos depresores del SNC

La anestesia general puede inducirse utilizando una gran variedad de fármacos y técnicas (Flecknell, 1998)

Agentes volátiles

Se administran por inhalación, siendo absorbidos por esta vía, pasando a sangre por la barrera alveolocapilar (Zuñiga, 2008). Antes se utilizaba óxido nitroso, éter y cloroformo, pero al ser irritantes, inflamables cancerígenos no se consideran seguros. En la actualidad, se usan gases halogenados como metoxiflourano, enflourano, halotano, isoflourano, sevoflourano y desflourano. Requieren de un equipamiento complejo y costoso.

El equipamiento consta de;

1. una máquina de anestesia que suministra el flujo de gas
2. un circuito que dirige el flujo de gas al animal.

La máquina cuenta con: fuente de gases (oxígeno, aire, etc); un reductor de presión, un regulador de flujo (se trata de un émbolo en tubo de vidrio graduado en Lts /min en roedores es de 3lts/min) y vaporizador (donde se deposita el anestésico líquido volátil).

Existen diferentes tipos de circuitos: abiertos, cerrados, semicerrados y cerrados. La elección va a depender del peso del paciente, la seguridad del animal y el ahorro del fármaco.

En roedores de laboratorio se utilizan circuitos abiertos o semiabiertos por la dificultad para intubarlos. Se coloca al animal con una mascarilla rodeando el hocico por donde fluyen los gases. La inducción se hará en una cámara de inducción de plástico metacrilato, transparente donde se colocará al roedor entre 1-5 minutos hasta que ocurre el volteo con una concentración de anestésico superior. Luego, se retira de la cámara y se lo coloca sobre camilla con la mascarilla, con la dosis de mantenimiento.

Agentes no volátiles:

La administración de estos agentes es parenteral ya sea IM, SC, oral o rectal. Ejemplos: barbitúricos, ketamina, propofol, etomidato, medetomidato, etc.

- Barbituricos: Son poco analgésicos. Deprimen SNC, corteza cerebral y tálamo. Generan aumento de la frecuencia cardíaca y reducen presión arterial. Producen depresión respiratoria central. Disminuyen la PIC. Producen efecto acumulativo. Se administran vía IV, de acción ultracorta, y son irritantes de mucosas. No se usa en roedores, pero si en gato, perro, rumiantes y cerdo. Se usa para inducción. Ejemplo: tiopental sódico, pentobarbital.
- Propofol: es un anestésico hipnótico de acción ultracorta. Disminuye la presión arterial y la frecuencia cardíaca. Sin efecto acumulativo. Se utiliza principalmente en goteo
- Etomidato y medetomidato: anestésicos hipnóticos de acción ultracorta similares a propofol y tiopental sódico. Se administran IV. Afectan mínimamente sistema cardiorrespiratorio. Se usa en roedores, cerdos y otros.

- Antagonistas NMDA (n-metil-D-aspartato) Arilciclohexaminas o Fenciclidinas Ketamina y tiletamina: son fármacos disociativos. Se usa en cualquier especie de laboratorio, aves, reptiles y hasta animales silvestres. Producen analgesia visceral con estado de anestesia superficial. Se observan ojos abiertos y dilatados, permaneciendo reflejo palpebral, laríngeo, podal, faríngeo (se indica con atropina). Aumenta la frecuencia cardíaca, y la presión arterial. Se combinan con diacepam, xilacina y medetomidina.
- Opioides: Son excelentes analgésicos pero malos hipnóticos y relajantes musculares. Poseen antagonistas. Se utilizan comúnmente en perros (IV) y ratas (IP)
- Otros: Tricaína (MS 222) y benzocaína: se usa en peces. El metosulfonato también se utiliza en otras especies acuáticas invertebradas.

Monitorización

Durante la anestesia se deberán controlar determinados parámetros en el paciente como:

Respuesta refleja:

Se debe comprobar ausencia de respuestas reflejas espontáneas como reflejo de estación, reflejo deglutorio, palpebral, podal, punción/compresión de la cola y oreja que nunca deben presentarse en un plano anestésico quirúrgico.

Oxigenación, circulación y ventilación:

Para control de oxigenación se debe observar que las membranas mucosas estén rosáceas. La circulación se controla mediante la palpación del pulso arterial femoral o aórtico; la palpación y auscultación del latido cardíaco o TLLC. La ventilación se monitorea mediante movimientos torácicos, el balón del circuito anestésico o la auscultación del tórax. Existen también, monitores electrónicos para control de la función cardiorrespiratoria. Se puede utilizar ventilación artificial mecánica. Se debe controlar la presión parcial de CO₂ en vías aéreas con un capnógrafo, o la saturación de O₂ con pulsioxímetro. Estos equipos son caros.

Control de temperatura

Mediante termómetro (difícil en roedores y animales pequeños). Se debe usar almohadilla térmica para evitar la pérdida de calor, sobre todo en animales pequeños.

Medidas de soporte

En roedores no se utilizan otras medidas de soporte como *vía aérea permeable* (ventilación espontánea de oxígeno) y *vía venosa permeable* mediante fluidoterapia (Zuñiga, 2008). Estas medidas sí se utilizan comúnmente en perros, ovinos, cabras y con cierta práctica, en gato y cerdo. En conejos, se pueden aplicar una vía venosa permeable a través de la vena de la oreja. Esta última vía, permite también aplicar fármacos de emergencia como dopamina o dobutamina ante un inminente paro cardíaco.

Período postanestésico

Es el período de recuperación anestésica donde ocurre el paso entre el período de inconsciencia producido por la anestesia, al de consciencia (Zuñiga, 2008). Es ideal que sea gradual, libre de excitación y dolor, hasta retornar su estado fisiológico lo antes posible

Entre los cuidados posoperatorios se debe controlar la frecuencia cardíaca y respiratoria.. La hipotermia es la complicación más frecuente, por lo que debemos procurar un ambiente de recuperación cálido y control periódico por parte del personal hasta que logre superar el período de sueño. En algunas especies se requiere jaula de contención para evitar traumatismos. Finalmente, para mejorar la recuperación se recomienda uso de analgésico postoperatorio. Los fármacos comúnmente utilizados son los mismos que para la premedicación como AINES, opioides y tramadol. En algunos casos, se requerirá aplicación de ATB y fluidoterapia (IV o SC).

Eutanasia

Por definición es el acto del sacrificio humanitario con el mínimo dolor, temor y angustia o stress. Deriva del griego donde “eu” significa bien o buena, y “thanatos” significa muerte.

En experimentación animal, la eutanasia puede indicarse como final de una experiencia, o cuando resulta muy elevado el nivel de dolor, angustia o sufrimiento, superando los niveles adecuados para su bienestar, o la imposibilidad de tratamiento. A su vez, puede utilizarse para la obtención de una muestra de sangre o tejido asociada al protocolo de estudio correspondiente. Asimismo, puede aplicarse con animales que no sean aptos para la cría o animales no utilizados o inadecuados. Es aplicable también en el PUNTO FINAL HUMANITARIO: donde se toman en cuenta criterios que sirven para finalizar un procedimiento más temprano, evitando el dolor, sufrimiento, y que el método empleado no altere los resultados experimentales.

La técnica tiene que ser indolora, que produzca una rápida inconsciencia y muerte, con mínima inmovilización, miedo y stress. En este sentido, también debe ser fiable y reproducible, irreversible, sencilla de realizar y que no produzca daño en los tejidos sobre todo los que son objeto de estudio. Para el operador debe ser estéticamente aceptable, segura y en lo posible económica.

La eutanasia requiere de personal entrenado que en primer lugar debe conocer la biología, fisiología, manejo y sujeción de la o las especies con la que trabaja. También debe reconocer los signos de dolor, temor y angustia, conociendo el comportamiento o conducta normal y anormal, y las respuestas fisiológicas asociadas al temor o angustia. Asimismo, debe entrenarse en los métodos y como realizarlos, el destino de los residuos o cadáveres, y nociones de bioseguridad en el manejo del reactivo biológico.

Es importante contar con el equipamiento adecuado para realizar el procedimiento y que el mismo deba ser periódicamente inspeccionados, asegurando su buen estado y limpieza de sangre, orina y heces de otros animales. (Leary. 2013)

Otro aspecto importante es que el método va estar condicionado por el objetivo de investigación, teniendo en cuenta que algunos métodos pueden alterar los órganos o los parámetros fisiológicos del animal en estudio. Por ejemplo, además de los métodos físicos que en general causan lesión por trauma de tejidos principalmente cerebrales, podemos mencionar que la inyección IP de barbitúricos puede formar artefactos para la histología de los tejidos intestinales, el anestésico inhalatorio isoflurano que puede elevar artificialmente las concentraciones de glucosa en sangre y el método por inhalación de CO₂ que puede elevar las concentraciones de potasio sérico, entre otras que debemos evaluar para decidir el método que mejor se adapte al objetivo del estudio.

La elección del método

Va a depender de una serie de factores:

- De la especie y asociado a su edad y principalmente al tamaño.
- Del estado de salud tomando en cuenta del tipo y grado de afectación orgánica y de los tejidos.
- Del propósito del estudio o destino del cadáver, utilizando los métodos aceptados que no alteren los resultados experimentales o no dañen los tejidos
- Del número de animales a sacrificar

Manejo e inmovilización

Todos los procedimientos de eutanasia aplicados a animales requieren de algún tipo de inmovilización y en este sentido es de vital importancia un control adecuado para minimizar el dolor y la angustia en los animales, y asegurar la bioseguridad del personal a cargo. El trato tiene que ser suave pero seguro. Algunos métodos, sobre todo los físicos, requieren mayor inmovilización. Puede ser necesaria la utilización previa de fármacos tranquilizantes o sedantes, cuando la captura pueda generar mayor dolor, lesiones, ansiedad en el animal, o peligro al operador. Para la eutanasia de animales debemos tener en cuenta que las maniobras de transporte, la manipulación, la ruptura de grupos compatibles son causa de estrés y que es casi imposible eliminar todas estas variables, pero si conocerlas y en la medida de lo posible reducirlas o controlarlas.

Mecanismos básicos de eutanasia

Los agentes pueden causar la muerte por:

- hipoxia cerebral que a su vez puede ser directa o indirecta.
- Depresión cerebral o neuronal para las funciones vitales.

- Interrupción física de la actividad del cerebro y destrucción de neuronas esenciales para la vida

Clasificación de los métodos más utilizados en animales de experimentación

En primer lugar, podemos mencionar que existen los métodos físicos y químicos. Los físicos producen la muerte por trauma cerebral directo y/o corte o ruptura de vasos para producir anoxia. En cambio, los métodos químicos producen hipoxia cerebral o depresión nerviosa severa. Estos se dividen en inyectables e inhalatorios.

También se pueden clasificar en métodos aceptables con animales conscientes y métodos para animales previamente inconscientes. Finalmente existe un listado de métodos inaceptables de eutanasia porque causan sufrimiento al animal o son peligrosos para el operador.

La elección de un método de eutanasia por cada experiencia particular debe contemplar las normativas vigentes al respecto, y deben ser evaluados por un comité de bioética para validar los resultados experimentales.

Métodos Físicos

Estos métodos producen pérdida inmediata de la conciencia por trauma físico en el cerebro. Cuando son bien realizados por personal entrenado producen mínimo dolor y/o angustia y no requieren de productos químicos. En particular requieren métodos de sujeción y/o inmovilización. Algunos producen solo inconciencia y debe confirmarse la muerte por otro método complementario. Estos procedimientos tienen como desventaja que resultan desagradables para la observación y no están recomendados para el sacrificio de muchos animales. En manos inexpertas se puede producir un dolor y angustia elevados. Tienen la ventaja de no requerir de sustancias que pudieran interferir con los objetivos del experimento.

Los métodos físicos aceptados en animales son:

- Disparo
- Dislocación cervical
- Concusión
- Irradiación con microondas
- Decapitación
- Aturdimiento eléctrico

Disparo

Es el método más empleado en mamíferos y reptiles de gran tamaño. Puede ser disparo con bala convencional (bala libre), con los riesgos que este método implica y una variante más segura de bala cautiva, donde un émbolo golpea a gran velocidad y por rebote vuelve produciendo concusión e inconsciencia por noqueo. Este método requiere el posterior corte de un

vaso de grueso calibre para la exanguinación y muerte. Es un método común utilizado en grandes animales en mataderos y frigoríficos.

Dislocación cervical

Es uno de los métodos más utilizados en pequeños roedores, ya que aunque no es agradable por el operador, es un excelente método por ser rápido y con mínimo dolor (este último más asociado a la a sujeción previa que al método en sí). Produce la muerte porque causa graves daños al tallo cerebral y una inconsciencia instantánea. Consiste en sujetar al animal sobre una superficie de agarre que puede ser la reja de la caja de alojamiento, para que no se resbale y tienda a sujetarse. Con una mano se toma la base de la cola y con la otra el cuello en la unión con la cabeza, maniobra a partir de la cual se realiza la tracción de la cola dislocando la cabeza con la consecuente ruptura del tallo cerebral y vasos sanguíneos del cuello. Es sencilla y efectiva, su inconveniente radica en que limita el número de animales por día y por operador, que no es agradable, que no sirve para estudios en los que se requiera intacto el tallo cerebral o toma de sangre. Se limita también, por el tamaño del animal y el desarrollo de la musculatura del cuello asociada. Como opción puede sujetarse la base de cola con una mano, utilizando un objeto romo en la base del cuello, como pinzas o tijeras quirúrgicas o de manejo. Puede ser empleado en ratones y en otros roedores jóvenes; en conejos, perros y gatos recién nacidos y en peces y aves. Los roedores y conejos de mayor tamaño, pero de peso inferior a 1 kg deben estar sedados o aturdidos previamente.

Concusión

Consiste de un golpe certero en el cráneo con un objeto romo diseñado para tal fin. Requiere de entrenamiento especial del operador, resultando una técnica alternativa a la de la bala cautiva en animales de mayor tamaño. Tiene que ser realizado por una persona experta, nunca se empleará el martillo o el hacha como método de aturdimiento. Este método puede asociarse con la dislocación, para asegurar la muerte por exanguinación o lesión irreversible del corazón o del cerebro, inmediatamente después del aturdimiento.

Puede utilizarse en animales pequeños como conejos pequeños, ratas, ratones, cobayas jóvenes, hámsteres, aves, pequeños reptiles, anfibios y peces.

Decapitación

Este método requiere de una guillotina o instrumento cortante especialmente diseñada para cada especie. Debe realizar la operación rápidamente y en un solo intento.

Requiere de un sistema de inmovilización y de controlar constantemente su buen funcionamiento, el filo y la limpieza. Se utiliza para estudios donde se quiere obtener tejidos nerviosos del cráneo intactos y en fresco. Es recomendable la sedación o aturdimiento previo teniendo en cuenta que esta maniobra no implique más sufrimiento al animal. El método consiste en la separación total del cuello y la cabeza. Se usa en roedores y conejos pequeños, peces, anfibios y aves. A pesar de considerarse un método aceptable, es recomendable el uso de otras alternativas.

Irradiación con microondas

Son aparatos especiales que concentran la microondas en un punto. Irradiación con microondas: se emplea en animales de peso menor a 300 g, aplicando una radiación de microondas sobre el cerebro. Es un método empleado por neurobiólogos para fijar los metabolitos cerebrales. Requiere la utilización de un equipamiento específico, y no es posible el uso de equipos domésticos.

- Animales de menos de 300 g
- Empleado en neurobiología

Aturdimiento eléctrico

Se utiliza preferentemente en especies de tamaño medio, se realiza aplicando una corriente eléctrica con un equipo especial que dispone de unas tenazas cuyos extremos se colocan a ambos lados de la cabeza o una horquilla específica para tal fin. Hay que asegurar la aplicación correcta de los electrodos, ya que en caso contrario puede provocar sufrimiento en el animal. El paso de la corriente eléctrica por el cerebro produce inconsciencia y sobre el corazón la parada por fibrilación ventricular. Dado que la inconsciencia es temporal, los animales deben sacrificarse con un método confirmatorio. Es común en cerdo y otros animales menores. La descarga aplica una corriente alterna de 70 a 350 voltios entre 4 y 30 segundos dependiendo del tipo de aparato y de la intensidad de la corriente y del tamaño y la especie de destino.

Métodos químicos

Se basan en la administración de agentes anestésicos inyectables y gases inhalatorios que producen inconsciencia, fallo cardiovascular, respiratorio y muerte. Debido a la posibilidad de que se produzcan errores en la dosificación o administración y el animal pueda recuperarse, siempre hay que confirmar la muerte. En roedores y animales pequeños puede estar limitadas la vía y los volúmenes de administración. Los agentes químicos que produzcan la muerte sin inconsciencia previa, no son aceptados (Por ejemplo: agentes paralizantes, cloruro potásico, etc.).

Agentes inyectables

Son principalmente anestésicos o los contienen en su composición. Se administran de forma concentrada para favorecer su efecto de depresión del SNC y la muerte.

Si se emplean otras sustancias tóxicas o paralizantes, éstas deben actuar siempre después de que el anestésico haya producido su efecto evitando el sufrimiento del animal. La vía de elección suele ser la intravenosa para que el mismo sea más rápido y potente. Como alternativa en pequeñas especies donde es limitado el acceso venoso puede emplearse la vía intraperitoneal. Las rutas enterales, intramuscular o subcutánea no son adecuadas porque inducen el efecto anestésico muy lentamente y requieren dosis superiores, y otras vías como la intraarte-

rial, intracardíaca o intrapulmonar se consideran inaceptables porque producen angustia y dolor. Algunos animales agresivos o difícilmente manipulables deben ser sedados previamente para poder manipularlos posteriormente y obtener un acceso venoso.

Los medicamentos anestésicos para las eutanasias son generalmente utilizados al doble o triple del recomendado de dosis anestésica. En todos los casos, la muerte debe ser confirmada por la destrucción del cerebro (Close, 1997).

Barbitúricos

Son los eutanásicos más empleados porque producen la muerte sin sufrimiento siendo además baratos. El fármaco más difundido es el pentobarbital, aunque también están disponibles otros barbitúricos no utilizados como anestésicos. Administrados por vía IV producen la muerte en pocos segundos por depresión del SNC y de los sistemas cardiovascular y respiratorio. También puede administrarse por vía IP, pero el elevado pH de la dilución produce dolor en la inyección y es recomendable diluirlo previamente para reducir o eliminar el malestar del animal. La administración intracardíaca sólo es aceptable cuando el animal está inconsciente.

T-61

Es una formulación de eutanasia específica para animales de experimentación. Corresponde a la presentación comercial de un barbitúrico asociado a un paralizante tipo despolarizante y un anestésico local, tetracaína, para reducir el dolor producido durante la administración IV. El efecto paralizante es simultáneo al anestésico, y el animal no sufre durante la eutanasia.

Agentes inhalatorios

Son todos aquellos agentes que pueden suministrarse en forma gaseosa. Ya sean anestésicos o gases eutanásicos. Los anestésicos inhalatorios son muy seguros por lo que en general requieren de dosis altas para eutanasia. Su uso como eutanásico va primordialmente asociado a un acto anestésico que culmina con el sacrificio del animal. Hay que tener en cuenta su metabolismo y los efectos fisiológicos que pueden causar en el momento de validar los resultados experimentales para los que se emplean.

Los animales pequeños como los roedores se introducen en cámaras o cajas con el gas. En animales mayores se utiliza la intubación endotraqueal o se utilizan cámaras especiales para inhalación del gas. Los agentes seleccionados deben ser tolerados por los animales para que no produzcan estrés ni convulsiones previas a la inconsciencia. No se recomiendan en recién nacidos por su tolerancia a la hipoxia.

Dióxido de carbono

Es uno de los agentes más utilizados para la eutanasia de animales pequeños. En concentraciones superiores al 60% por su efecto anestésico produce inconsciencia y concentraciones

superiores al 70% se emplean para producir la muerte. Tiene como desventaja que puede producir ansiedad y estrés en los animales, motivo por el cual este método es evaluado permanentemente. Para reducir el malestar previo a la muerte se administran flujos rápidos de CO₂ o bien se llena la cámara previamente de este gas con la administración simultánea de oxígeno (33% del flujo de CO₂ + O₂). Como el CO₂ es más pesado que el aire los animales se deben ubicar en la zona inferior de una cámara. Se puede colocar una rejilla o tope en la zona superior, para que los animales no puedan trepar. Las cámaras deben poseer un orificio inferior de ingreso del gas y un orificio de salida, en la parte superior que se cierra una vez que se produjo la inconsciencia y se llega a concentración adecuada. Existen equipos disponibles comercialmente para la eutanasia efectiva.

La técnica puede producir excitación o una inducción a la inconsciencia demasiado larga en especies de tamaño medio, como gato, perro o cerdo, y en peces y otros animales de sangre fría, por lo que puede no recomendarse (Ampan, 2014).

Monóxido de carbono

Es un método que se utilizaba antiguamente para animales pequeños. Es suficiente una concentración del 6% en cámaras selladas. Es un gas inodoro e incoloro. Tiene la desventaja que es peligroso su uso en ausencia de equipos adecuados y espacios ventilados. Este gas se combina de manera irreversible con la hemoglobina e impide que el oxígeno sea transportado, siendo peligroso para el manejo del operador, por lo que no es un método recomendado.

Anestésicos inhalatorios

Producen inicialmente anestesia, y después muerte por sobredosis. Resulta un método humanitario y bien tolerado. Los anestésicos más adecuados son los halogenados como el halotano o el isoflurano. El primero es más barato y tolerado que el segundo, pero ambos actúan rápidamente en la mayoría de las especies, sobre todo en roedores. En el conejo debe existir una inconsciencia previa con una combinación inyectable. Solo no se utiliza porque la inhalación directa puede producir angustia y sufrimiento por hipoxia. El halotano tiene como desventaja su metabolismo hepático, que puede alterar estudios específicos.

Agentes para animales acuáticos

En estas especies se utilizan agentes se diluyen en el agua, como la benzocaína, la triclaína metano sulfonato (MS-222), el etomidato y metomidato, y la quinaldina. Según su concentración en agua producen depresión del Sistema Nervioso Central (SNC) y la muerte.

Métodos aceptables en animales inconscientes

En general se asocian a métodos de confirmación de muerte en animales noqueados o previamente sedados o anestesiados. En todos los casos su uso deberá ser evaluado y justificado por el método seleccionado contemplando el destino de los estudios y la disponibilidad del método y la no existencia de otras maniobras adecuadas. En todas estas técnicas hay que confirmar la muerte del animal.

Exanguinación

Consiste en la lesión de vaso de gran calibre como las arterias aorta, carótidas o femorales o las venas cavas, yugular o femorales; o la punción cardíaca directa en especies menores. Produce una pérdida aguda y masiva de la volemia con el consecuente paro cardíaca. No es un método aceptable en aves y en animales de sangre fría (poiquilotermos) por su elevada tolerancia a la hipoxia.

Inserción de aguja

Hay que realizarla en animales aturcidos o anestesiados, con un operador experimentado. Se emplea en aves, peces, anfibios y reptiles introduciendo una aguja por el foramen magno hasta la base del cerebro, lesionándolo.

Embolia gaseosa

La inyección de un embolo de aire en cantidades suficientes produce el taponamiento de capilares pulmonares e imposibilitan la oxigenación y circulación de la sangre.

Congelación rápida

Es la introducción del animal o su cabeza en nitrógeno líquido. También existen equipos especializados o túneles de congelación. Permite obtener tejidos, como el cerebro, en condiciones óptimas para su estudio, sin que se produzca hipoxia. Suele emplearse en animales pequeños.

Nitrógeno/argón

Sólo se emplea en animales anestesiados y producen la muerte por hipoxia reduciendo o eliminando el oxígeno de la mezcla de gas respirada.

Etol e hidrato de cloral

La sobredosis de etanol e hidrato de cloral, produce depresión del SNC y paro respiratorio.

Cloruro de potasio

El exceso de ión potasio en la sangre produce fallo cardíaco y muerte. Es un agente muy barato y eficaz a dosis (sobredosis) adecuadas. Hay que confirmar la muerte del animal.

Métodos inaceptables de eutanasia

Son todas técnicas que pueden inducir dolor intenso, muerte lenta, ser estéticamente desagradables, tóxicas para el operador o peligrosas, por lo que son métodos inaceptables y además poco prácticos.

Entre ellas podemos mencionar descompresión/vacío, hipotermia e hipertermia, ahogamiento, rotura de cuello y estrangulación dentro de los métodos físicos. Por otro lado, anestésicos, sedantes, paralizantes musculares o bloqueantes neuromusculares y narcóticos de acción lenta o errática; y agentes químicos como ciclopropano, éter, cloroformo, ácido cianhídrico, tricloroetileno, potencialmente peligrosos (Close, 1996).

Algunas consideraciones sobre especies invertebradas

En la actualidad, cada vez está siendo más frecuente el uso de especies invertebradas en investigación (Lewbart, 2010). Esto abre un campo interesante en la incumbencia del profesional veterinario. Por un lado, basados en el criterio de las 3R, muchos investigadores están intentando reemplazar estudios que involucran vertebrados superiores por invertebrados, justificados en el uso de equipamiento más simple y económico, y además, por ser especies con menor capacidad de sentir dolor. Aunque esto último, está en profundo debate.

La mayoría de las especies invertebradas presentan un desarrollo nervioso más rudimentario que los vertebrados, sin embargo, no significa que no presenten respuestas aversivas a estímulos dolorosos y cambios en el comportamiento como han indicado numerosos estudios en crustáceos, moluscos e insectos como *Apis mellifera* y *Bombyx nori* (Lewbart, 2010)

Se sabe que los cefalópodos poseen un sistema nervioso muy desarrollado con un cerebro recubierto de un cráneo cartilaginoso que responde a estímulos dolorosos como cualquier vertebrado.

Si bien se desconocen terapias analgésicas, es común el uso de anestésicos en estas especies aplicados de forma inhalatoria como isoflurano (en insectos terrestres y artrópodos), o en el agua, para especies acuáticas como metanosulfonato (insectos, crustáceos, etc.) o cloruro magnésico (cefalópodos). Incluso la eutanasia, se debe realizar con previa insensibilización (anestesia) antes de la destrucción física por congelación, decapitación, ebullición, inmersión en etanol o formalina. De hecho, el enfriamiento comúnmente usado para sujeción de insectos y arañas, se considera adecuado para maniobras no dolorosas. En todos los casos, se recomienda minimizar o refinar los procedimientos traumáticos.

La incipiente medicina de invertebrados y su actual crecimiento, evidencia la necesidad de profundizar nuestro conocimiento en el manejo de dolor de especies no tradicionales de laboratorio, donde el enfoque veterinario resulta imprescindible.

Referencias

- Aguilar, R. F., Hernández, S. M., Divers, S. J., & Perpiñán, D. (2010). Atlas de medicina de animales exóticos. Bs As: Interamericana
- Amparan, AA, Djoufack-Momo, SM y Grunden, B. (2014). Exposición del personal de investigación al dióxido de carbono durante los procedimientos de eutanasia. *Revista de la Asociación Estadounidense de Ciencia Animal de Laboratorio*, 53 (4), 376-380.
- Close, B., Banister, K., Baumans, V., Bernoth, EM, Bromage, N., Bunyan, J., Warwick, C. (1996). Recomendaciones para la eutanasia de animales de experimentación: Parte 1. *Animales de laboratorio*, 30 (4), 293-316.
- Close, B., Banister, K., Baumans, V., Bernoth, EM, Bromage, N., Bunyan, J., y Warwick, C. (1997). Recomendaciones para la eutanasia de animales de experimentación: Parte 2. *Animales de laboratorio*, 31 (1), 1-32.
- Botana López, LM, Landoni, MF, y Martín-Jiménez, T. (2002). Farmacología y terapéutica veterinaria. Madrid: McGraw-Hill Interamericana
- Brown, L. (2000). Acuicultura para veterinarios. Producción y clínica de peces. España: Acribia.
- Flecknell, PA (1998). Laboratorio de anestesia animal. Una introducción para investigadores y técnicos. España: Acribia
- Kohn, DF, Martin, TE, Foley, PL, Morris, TH, Swindle, MM, Vogler, GA y Wixson, SK (2007). Directrices para la evaluación y el tratamiento del dolor en roedores y conejos. *Revista de la Asociación Estadounidense de Ciencias de los Animales de Laboratorio*, 46 (2), 97-108.
- Leary S, Underwood W, Lilly E, et al (2013) AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2013 Edition. American Veterinary Medical Association, Schaumburg, Illinois
- Lewbart, G. A. (2010). Medicina de los invertebrados. España: Acribia.
- Meredith, A., Redrobe, S. (2013). Manual de animales exóticos. España: Lexus.
- Zúñiga, J. M., Muriana, J. M. O., Tur, J. A. (2008). Ciencia y tecnología del animal de laboratorio: formación avanzada de postgrado. España: SECAL