

Enriquecimiento ambiental en ratones de laboratorio: Cómo afecta la productividad el uso de diferentes materiales para la formación de nido y el número de hembras por caja

Maschi, F.^{1*}, Principi, G.¹, Juárez, F.¹, Rogers, E.¹, Corva, S.², Carbone, C.¹

1. Departamento de Producción Animal - Cátedra de Animales de Laboratorio y Bioterio;

2. Departamento de Epizootiología - Curso de Bioestadística;

Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP – Calles 60 y 118 s/n. (1900), La Plata.

*Correo electrónico: fmaschi@fcv.unlp.edu.ar

No existe conflicto de intereses.

Palabras clave

Enriquecimiento ambiental, ratones, nidos, productividad.

Keywords

Environmental enrichment, mice, nest, productivity.

RESUMEN

El enriquecimiento ambiental (EA) en roedores de experimentación contribuye a mejorar su bienestar y permite a los animales modificar su entorno de acuerdo con sus necesidades. Una manera de realizar EA en la etapa reproductiva, es colocándoles materiales para la formación de nidos. El objetivo de este trabajo fue estudiar en cuatro líneas de ratones la preferencia por el material para formar el nido como parte del EA y el efecto que tiene este factor en la productividad con distinta relación entre hembras y machos por caja. Se determinó el número de crías nacidas, destetadas y su mortalidad. Se concluyó que si bien ninguno de los materiales empleados tuvo influencia sobre los parámetros de productividad seleccionados, todos los grupos de animales utilizaron en distinta forma los materiales suministrados adaptándolos a sus necesidades.

SUMMARY

Environmental enrichment in laboratory rodents: How different materials for nest building and the number of females per box affect the productivity.

Environmental enrichment (EE) in experimental rodents contributes to improve their well-being and allows animals to modify their environment according to their needs. EE in the reproductive live of mice can be produced by placing materials for nests building in their cage. The objective of this work was to study, the preference for the material for nests as part of the EE and the effect of this factor in productivity with different relationship between females and males per box in four lines of mice. The number of newborn, weaned pups and their mortality was established. It was concluded that while none of the materials used for the nests had influence on the selected parameters of productivity, all groups of animals used the materials supplied in different ways in accordance with their needs.

Introducción

El uso de enriquecimiento ambiental (EA) en ratones de experimentación es una manera de contribuir con el bienestar de los animales que se mantienen en cautiverio. Desde hace una década, ya sea por exigencias de la legislación de cada país o de las instituciones, a través de los comités institucionales de cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL), se agrega o incorpora el enriquecimiento al ambiente de los animales lo cual contribuye a mejorar el bienestar de los mismos, siendo numerosos los estudios que fundamentan el efecto favorable que produce^{1, 8, 7}. Es importante aclarar que debido a que la implementación de esta temática es muy reciente existen argumentos contradictorios acerca de si el EA beneficia a los animales y a los resultados que se obtienen con ellos, o si ejerce un efecto benéfico sobre el animal pero agrega una serie de variables experimentales que pueden influir en los resultados

que se obtengan.

En nuestro país, para el mantenimiento de la mayoría de los pequeños roedores de experimentación, se emplea en su microambiente una caja con un lecho generalmente de viruta de madera blanda y blanca, que absorbe la humedad, la orina y las heces y les brinda confort en el alojamiento. Hay autores que afirman que debido a que el lecho es un factor del ambiente con el cual los animales están en contacto continuo durante toda su vida, los materiales y la calidad que se usan para este fin y para la construcción de nidos como enriquecimiento pueden influir en su bienestar¹.

A través de las observaciones del comportamiento de los roedores silvestres se ha podido establecer que los ratones emplean cualquier material disponible para construir un nido durante la preñez. En muchos bioterios, para que los animales puedan desarrollar este tipo de comportamiento se les debe proveer el material para que lo construyan, lo

que se considera además de ser una forma de EA, una mejora en su bienestar^{1, 12}. Los materiales empleados para nidos tienen además la función de regular la temperatura, evitar el exceso de luz, y servir para refugiarse de congéneres más agresivos¹⁴.

Existe una gran diversidad de materiales que pueden emplearse para la construcción de nidos, pero se debe tener presente que, al igual que todos los insumos, estos deben reunir las condiciones que permitan someterlos a procesos de esterilización, por ejemplo, resistir la temperatura de autoclavado. Entre los materiales más utilizados se encuentran: la paja, el papel, el cartón, los ovillos de hebras de madera, el algodón y la viruta de madera. En la literatura existen estudios de preferencia de materiales en los cuales se ha evaluado la predilección de alguno de ellos para construir los nidos^{3, 2, 10}, uno de estos interesantes resultados revela que los ratones machos muestran la misma preferencia tanto para el papel

como para la madera, lo cual indica su participación en la construcción del nido^{9,13,14}.

Por otra parte se debe considerar que el éxito en la reproducción en las colonias de ratones es consecuencia directa de la forma de apareamiento y del sistema de manejo reproductivo que se emplee. Los ratones se aparean generalmente en parejas monogámicas o bien un macho y más de una hembra por caja. En este último caso la relación de machos por hembras puede ser desde 1:2 hasta 1:7.5.

Se ha observado que cuanto mayor es el número de hembras por macho, menor es el número de crías destetadas por hembra⁶, hay diferencias en el tamaño de la camada, en el intervalo entre partos y se incrementa además la mortalidad pre destete. También se ha determinado que estas variaciones difieren según la cepa de ratones de que se trate⁴.

El objetivo de este trabajo fue estudiar en cuatro líneas de ratones la preferencia por el material para formar el nido como parte del EA y el efecto que tiene este factor en la productividad con distinta relación entre hembras y machos por caja. Este trabajo ha sido aprobado por el CICUAL (comité institucional de cuidado y uso de animales de laboratorio) de la FCV-UNLP.

Materiales y métodos

Animales: Se utilizaron 4 líneas de ratones, 3 endocriadas: BALB/cJLP,

BALB/cAnNLP y C57BL/6JLP; y una línea exocriada LPN:NIH(S)-Fox1^{nu}. Todos los animales fueron SPF (libres de patógenos específicos), y adultos reproductores provenientes de la colonia del Bioterio de la FCV UNLP.

Los animales se mantuvieron en las salas de producción del mencionado bioterio, se alojaron en cajas de acero inoxidable de 18 x 29 x 13 cm con tapa reja de acero inoxidable y lecho de viruta de madera. Los insumos se esterilizaron por autoclave de vapor: lecho de viruta de madera de álamo tamizada, agua en mamadera individual y alimento extrusado rata – ratón Cooperación (*ad libitum*). Todas las líneas murinas se mantuvieron en cuartos separados, con aire filtrado a través de filtros absolutos de alta eficiencia (HEPA), con 15 renovaciones por hora, a una temperatura ambiente de 22 +/- 2 °C, 30 – 70 % de humedad relativa, y un fotoperíodo de 14 horas luz y 10 horas oscuridad.

Material para nido: El material para construcción de nido consistió en:

A) Papel madera en trozos de 8 x 3 cm.
B) Ovillo de hebras de madera (10 cm diámetro).

Estos insumos fueron esterilizados en autoclave a vapor, a 121°C durante 20 minutos y 30 de secado.

Procedimiento: Para cada línea de ratones, el número de hembras apareadas por macho fue desde 1:1, 1:2 y 1:3 respectivamente siguiendo el esquema que se describe en la tabla 1.

Todas las cajas de animales que se utilizaron, recibieron desde el primer día de apareamiento y al mismo tiempo, los materiales para la confección del nido (papel madera y ovillo de hebras de madera). Estos materiales se siguieron proveyendo con cada cambio semanal de las cajas.

El papel se suministró en 3 trozos de 8 x 3 cm. y los ovillos de hebras de madera de un tamaño de 10 cm aproximadamente. A las cajas controles no se les suministró ningún material extra para formar nido.

En todos los animales se controló la productividad durante 6 meses a través de la medición de los siguientes parámetros: número de nacimientos, número de animales destetados, y mortalidad pre destete. Este último dato se obtuvo en forma de porcentaje, a través de la diferencia de animales nacidos y destetados.

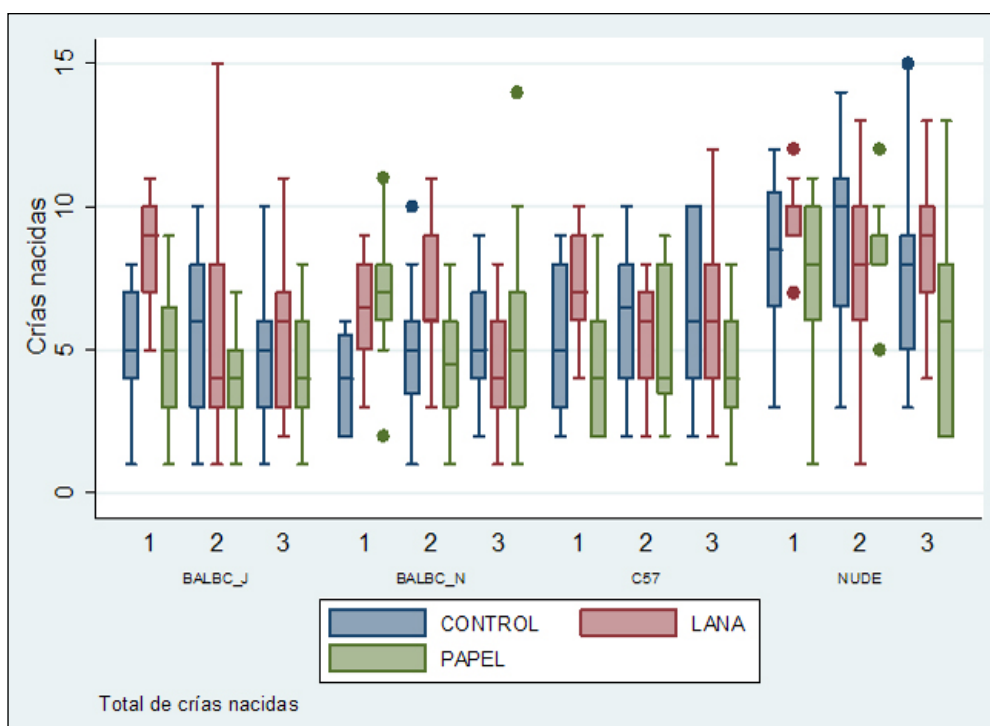
Análisis estadísticos:

Los datos fueron procesados mediante el paquete estadístico Stata 11 (College Station Park, Texas). Se utilizó un análisis de varianza anidado y con repeticiones para cada una de las variables en estudio (total de nacimientos, animales destetados y mortalidad). El anidamiento fue aplicado en un nivel jerárquico de menor a mayor para los efectos fijos y aleatorios (caja / nido / apareamiento / cepa) y las repeticiones se evaluaron a nivel del número de cama por caja.

Tabla 1.
Número de hembras apareadas por macho

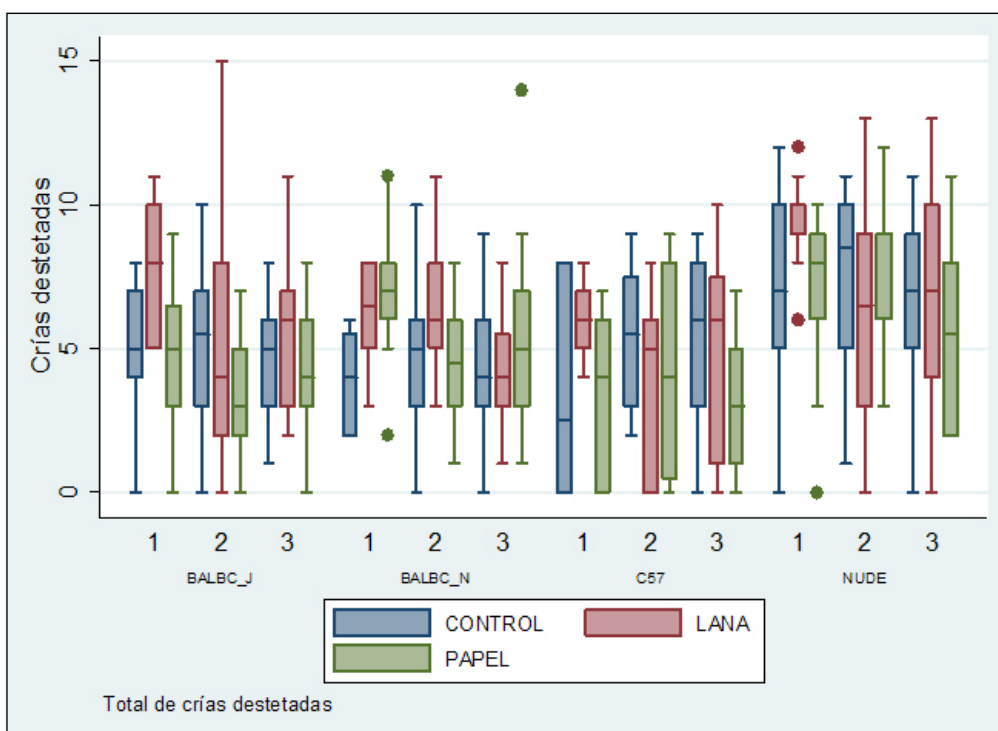
Línea de ratón	Nº hembras apareadas por macho	Número de cajas con papel	Número de cajas con ovillo	Número de cajas control
BALB/cJLP	1	2	2	2
	2	2	2	2
	3	2	2	2
BALB/cAnNLP	1	2	2	2
	2	2	2	2
	3	2	2	2
C57BL/6JLP	1	2	2	2
	2	2	2	2
	3	2	2	2
LPN:NIH(S)-Fox1 ^{nu}	1	3	3	2
	2	2	2	2
	3	2	2	2

Figura 1.
Diferencias entre las distintas líneas para el total de crías nacidas de acuerdo con el anidamiento utilizado



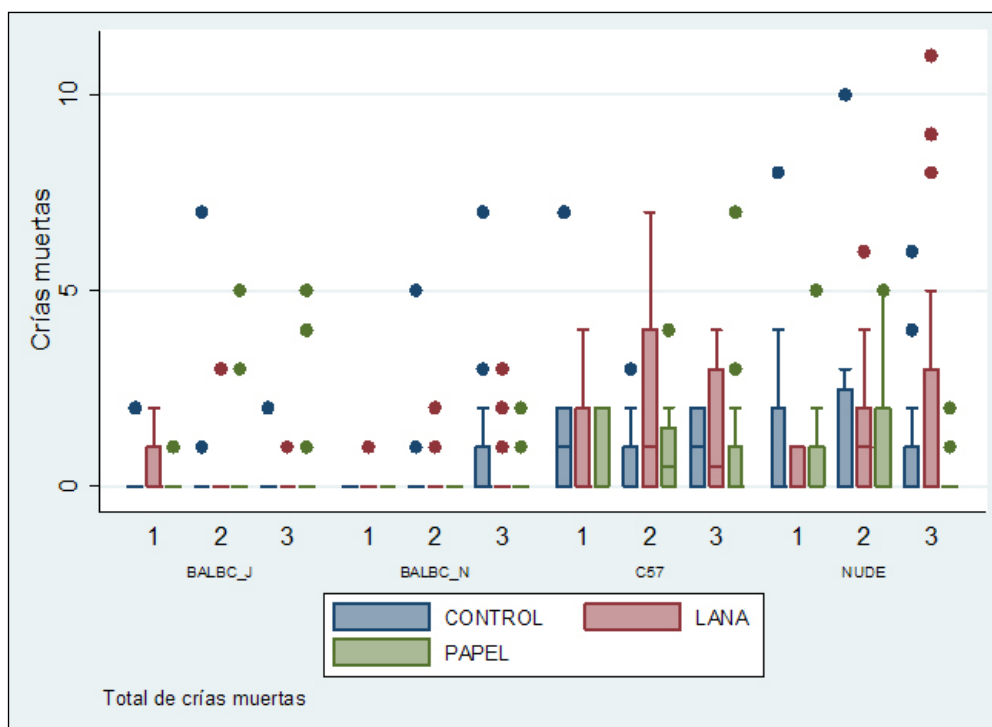
1: 1 hembra por apareo; 2: 2 hembras por apareo; 3: 3 hembras por apareo.

Figura 2.
Total de crías destetadas de acuerdo con el anidamiento utilizado



1: 1 hembra por apareo; 2: 2 hembras por apareo; 3: 3 hembras por apareo.

Figura 3.
Total de individuos muertos de acuerdo con el anidamiento utilizado



1: 1 hembra por apareo; 2: 2 hembras por apareo; 3: 3 hembras por apareo.

Resultados

Para las tres variables evaluadas (nacimientos, destetes y mortalidad) se observaron diferencias significativas en las cuatro líneas ($p < 0,05$), no demostrándose similar situación para el resto de los efectos aleatorios (nido y forma de apareamiento), como tampoco interacción entre los mismos. La Figura 1 muestra la diferencia entre las distintas líneas para el total de crías nacidas de acuerdo con el anidamiento utilizado en análisis estadístico.

Similar observación se detalla en la Figura 2 para el total de crías destetadas. Para el número de individuos muertos se observa similar comportamiento, no evidenciando el análisis estadístico diferencias demostrables para las variables bajo control, por ejemplo el tipo de nido.

Se observan valores extremos para

mortalidad entre las distintas líneas, por ejemplo: canibalismo en C57BL/6 en las primeras camadas, sin dejar de tener en cuenta posibles factores no controlados que afecten el índice de mortalidad; por ejemplo: inundación de la caja (Figura 3).

Discusión

Los materiales empleados como EA para la formación de nido no tuvieron influencia con respecto a los parámetros de productividad evaluados. Esto indica que cualquiera de ellos podría utilizarse en las colonias de producción indistintamente. Sin embargo, a través de las observaciones que se realizaron en cada línea se pudo determinar que:

- Todos los grupos formaron un nido bien delimitado con papel, recortando los trozos grandes y colocando los

pequeños fragmentos formando un nido circular.

- En el caso de las líneas C57BL/6JLP, BALB/cJLP, y BALB/cAnNLP, formaban el nido de ovillos de hebras de madera solamente cuando estaban a punto de parir, en cambio los LPN:NIH(S)-*Fox1tm* no lo emplearon para hacer el nido desparramándolo en el resto del lecho de viruta.

- En las cajas control sin material para nido, las hembras agrupaban a las crías sobre un montículo, a manera de nido hecho de la viruta usada como lecho.

Si bien se determinó estadísticamente que no hubo evidencia demostrable entre la productividad y los distintos materiales para nidos empleados, pudo establecerse la importancia que tiene el hecho de enriquecer el ambiente, ya que todos los animales que se estudiaron transformaron su entorno y lo adaptaron a sus necesidades.

Bibliografia

1. **Brain PF, Buttner D, Costa P, et al. Rodents.** The international workshop on the accommodation of laboratory animals in accordance with animal welfare requirements, Berlin, 1993, pp 17-19.
2. **Cunliffe-Beamer TL, Les EP.** The laboratory mouse. En: Poole T, editor. UFAW (Universities Federation for Animal Welfare) handbook on the care and management of laboratory animals. 6th ed. Harlow, Essex, Longman Scientific and Technical, 1987, p. 275-308.
3. **Eskola S, Kaliste-Korhonen E.** Nesting material and number of female per cage: effects on mouse productivity in BALB/c, C57BL/6J, DBA/2 and NIH/S mice. *Lab Animals* 1993; 33: 122-128.
4. **Festing M.** Some aspects of reproductive performance in inbred mice. *Lab Animals* 1968; 2: 89 -100.
5. **Festing M.** Animal production and breeding methods. En: Poole T, editor. UFAW (Universities Federation for Animal Welfare) handbook on the care and management of laboratory animals. 6th ed. Harlow, Essex, Longman Scientific and Technical, 1987, p. 18-34.
6. **Heine W.** Problems of large scale production. *Food and Cosmetics Toxicology* 1965; 3: 223 - 228.
7. **Olsson IAS, Dahlborn K.** Improving housing conditions for laboratory mice: a review of 'environmental enrichment'. *Lab Animals* 2002; 36: 243 – 270.
8. **Patterson-Kane EG.** Environmental enrichment for laboratory rats: a review. *Animal Technol* 2001; 52: 77– 84.
9. **Pelkonen KHO, Hiinninen OOP.** Cytotoxicity and biotransformation inducing activity of rodent beddings. A global survey using the Hepa-I assay. *Toxicology* 1997; 122: 73 - 80.
10. **Potgieter FJ, Torronen R, Wilke PI.** The in vitro enzyme-inducing and cytotoxic properties of South African laboratory animal contact bedding and nesting materials. *Lab Animals* 1995; 29: 163 -171.
11. **Van de Weerd HA, Baumans V.** Environmental enrichment in rodents. En: *Environmental Enrichment Information Resources for Laboratory Animals*. AWIC Resource Series, 1995; 2: 145 – 149.
12. **Van de Weerd HA, Baumans V, Van Zutphen LFM.** Nesting material as enrichment in two mouse strains. *Proceedings of Joint Intern Conference of ICLAS, Scand-LAS and FinLAS, Helsinki 1995*. *Scandinavian J Lab Animal Sci* 1996; 23: 119 - 123.
13. **Van de Weerd HA, Van Loo PLP, Koolhaas JM, Van Zutphen LFM, Baumans V.** Preferences for nesting materials as environmental enrichment for laboratory mice. *Lab Animals* 1997; 31: 133 – 143.
14. **Van de Weerd HA, Van Loo PLP, Koolhaas JM, Van Zutphen LFM, Baumans V.** Preferences for nest boxes as environmental enrichment for laboratory mice. *Anim. Welfare* 1998; 7: 11-25.