



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

**Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**EL EFECTO DEL ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL SOBRE
LA VARIABILIDAD DE PARÁMETROS FISIOLÓGICOS Y
CONDUCTUALES EN RATONES DE LABORATORIO**

Autor: Fabricio Alejandro Maschi

Año 2017

Directora: Prof.M.V. Cecilia Carbone

Codirector: Dr. Héctor Ricardo Ferrari

Lugar de trabajo: Laboratorio de Animales de Experimentación (LAE) FCVUNLP

Miembros del jurado: Dra. Marcela Rebuelto- Dra. Alicia Antonini - Dra. Patricia Black

“Muy próximo al ridículo de negar una verdad evidente se halla el tomarse los más grandes trabajos para defenderla, y ninguna verdad me parece más evidente que la de que los animales se hallan dotados de pensamiento y razón lo mismo que los hombres. Los argumentos son en este caso tan manifiestos, que no escapan nunca a la atención del más estúpido e ignorante”.

David Hume, 1735.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata por darme la oportunidad de desarrollarme como profesional.

A mi directora, Prof. Cecilia Carbone por confiar en mí, por el estímulo constante en mi formación profesional y académica, por su apoyo incondicional y ayudarme a formar y ser mejor persona.

Al Dr. Ricardo Ferrari, por aceptarme en la codirección de este trabajo, por su apoyo constante y mostrarme un enfoque diferente hacia los animales de laboratorio.

A mis compañeros del Bioterio del LAE, por su generosa, continua e importante ayuda. Por las charlas, las risas, la confianza, el compañerismo y la amistad diaria.

A la Dra. Alicia Antonini, por sus aportes y su colaboración en el análisis estadístico de los datos, y hacerme comprender qué esconden los números.

Al Dr. Guillermo Docena y equipo por el procesado de las muestras por ELISA.

A mi esposa María Beatriz (Tele), mi compañera de andanzas en esta vida, por su ayuda, sus consejos, por dejarme formar una hermosa familia y por su amor sin condiciones.

A Franco mi hijo, heredero de mis pasiones que me renueva día a día las ganas de seguir adelante.

A Vale, mi hermana en quien siempre puedo confiar.

A mis padres que hicieron un gran esfuerzo para que hoy sea el profesional que elegí ser.

A todos los que de alguna manera estuvieron y están siempre a mi lado.

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

%: porcentaje

μl: microlitro.

>: mayor

<: menor

Ad libitum: a disponibilidad

ANOVA: análisis de la varianza

ASHRAE: American Society of Heating, Refrigerating and Air-conditioning Engineers

BALB/c: ratones endocriados

BPL: buenas prácticas de laboratorio

CA: campo abierto

CICUAL: Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.

cm: centímetros

cm²: centímetros cuadrados

dB: decibeles

DO: densidad óptica

EA: Enriquecimiento ambiental

ELISA: enzimo inmuno ensayo.

F: relación de varianzas

F0: filial cero o generación inicial

F1: primer filial o generación

FCV: Facultad de Ciencias Veterinarias

FELASA: Federación Europea de Asociaciones de Ciencia de Animales de

Laboratorio.

g: gramos

HAN: sistema de reproducción programada para mantenimiento de exocria

HEPA: filtros absolutos de alta eficiencia

Ho: hipótesis nula

hs: horas.

LAE: Laboratorio de Animales de Experimentación.

mg/m³: miligramos por metro cúbico

mg: miligramo.

min: minutos.

ml: mililitro.

N: normal

N:NIH(S)-FoxN1⁺⁺(Swiss): ratones exocriados

NH₃: amoníaco

Nº: número

NS: no significativo

°C: grado centígrado.

OO: recorrido en círculos completos

ej.: ejemplo

p: probabilidad

PCB: bifenilopoliclorado

pH: potencial hidrogeno

PNH: primate no humano

ppm: partes por millón

RPM: revoluciones por minuto

S: significativo

SIC: del latín “así, que es literal”

SNB: Sistema Nacional de Bioterios.

SPF: libres de patógenos específicos (del inglés)

TLV: (del inglés) Threshold Limit Value- valor límite de umbral

UNLP: Universidad Nacional de La Plata

σ^2 : varianza

VLU: valor límite de umbral

VV: vaivén

INDICE GENERAL

Abreviaturas y símbolos.....	IV
Índice de tablas.....	IX
Índice de figuras.....	XII
Resumen.....	1
Palabras clave.....	1
Summary.....	2
Key words.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Introducción a la ciencia de los animales de laboratorio.....	3
1.2 Estandarización de los animales de laboratorio.....	9
1.3 El ambiente de los animales de laboratorio.....	12
1.4 Macroambiente.....	13
1.5 Microambiente.....	24
1.6 Conducta; Estrés y Bienestar	38
1.7 Enriquecimiento ambiental.....	80
1.8 Ética en el trabajo con animales de laboratorio.....	87
1.9 Estado del conocimiento.....	90
1.10 Introducción a la problemática planteada.....	95
2. HIPÓTESIS.....	100
2.1 Hipótesis de trabajo.....	100
3. OBJETIVOS.....	101
3.1 Objetivo general.....	101

3.2	Objetivos parciales.....	101
4.	MATERIALES Y METODOS.....	102
4.1	Autorización para realización del proyecto.....	102
4.2	Flujograma de las actividades.....	103
4.3	Animales de experimentación.....	104
4.4	Elementos de enriquecimiento.....	106
4.5	Campo Abierto.....	108
4.6	Descripción de las pautas comportamentales en el campo abierto.....	112
4.7	Comportamiento de madres con enriquecimiento y sus crías.....	114
4.8	Extracción de sangre.....	115
4.9	Obtención de suero.....	115
4.10	Técnica de titulación de la hormona.....	115
4.11	Análisis estadístico.....	116
5	RESULTADOS.....	118
5.1	Resultados de las pautas comportamentales – cepa BALB/c.....	119
5.2	Resultados de las pautas comportamentales – stock Swiss.....	134
5.3	Resultados de los valores de corticosterona.....	150
5.4	Resultados de las conductas de las madres F1 para con sus crías.....	154
6	DISCUSIÓN.....	155
6.1	Ratones BALB/c.....	155
6.2	Ratones Swiss.....	158
7	CONCLUSIONES.....	165
8	CONSIDERACIONES ETICAS.....	167

9 BIBLIOGRAFIA.....168

INDICE DE TABLAS

Tabla 1- Relación de temperatura y humedad relativa entre las distintas especies de animales de laboratorio.....	14
Tabla 2- Criterios deseables para el lecho de contacto de los roedores.....	29
Tabla 3- Recomendaciones de espacio mínimo comúnmente usados en roedores de laboratorio alojados en grupo.....	32
Tabla 4- Etograma.....	111
Tabla 5- Etograma de madres con crías.....	114
Tabla 6- Conducta acicalamiento, Cepa BALB/c, resumen estadístico de grupos..	119
Tabla 7- Conducta acicalamiento, Cepa BALB/c, comparación entre grupos.....	119
Tabla 8- Conducta orinar, Cepa BALB /, resumen estadístico de grupos.....	121
Tabla 9- Conducta orinar, Cepa BALB /c, comparación entre grupos.....	121
Tabla 10- Conducta defecar, Cepa BALB/c, resumen estadístico de grupos.....	122
Tabla 11- Conducta defecar, Cepa BALB/c, comparación entre grupos.....	122
Tabla 12- Conducta freezing, Cepa BALB/c, resumen estadístico de grupos.....	123
Tabla 13- Conducta freezing, Cepa BALB/c, comparación entre grupos.....	124
Tabla 14- Conducta desplazamiento por los bordes VV, Cepa BALB/c, resumen estadístico de grupos.....	125
Tabla 15- Conducta desplazamiento por los bordes VV, Cepa BALB/c, comparación entre grupos.....	125
Tabla 16- Conducta desplazamiento por los bordes OO, Cepa BALB/c, resumen estadístico de grupos.....	126
Tabla 17- Conducta desplazamiento por los bordes OO, Cepa BALB/c,	

comparación entre	
grupos.....	127
Tabla 18- Conducta exploración olfateo, Cepa BALB/c, resumen estadístico de grupos.....	128
Tabla 19- Conducta exploración olfateo, Cepa BALB/c, comparación entre grupos.....	129
Tabla 20- Conducta exploración sobre miembros posteriores, Cepa BALB/c, resumen estadístico de grupos.....	130
Tabla 21- Conducta exploración sobre miembros posteriores, Cepa BALB/c, comparación entre grupos.....	130
Tabla 22- Conducta desplazamiento por el centro, Cepa BALB /c, resumen estadístico de grupos.....	131
Tabla 23- Conducta desplazamiento por el centro, Cepa BALB /c, comparación entre grupos.....	132
Tabla 24- Relaciones de varianza, Cepa BALB/c, comparación entre grupos control y juguete.....	133
Tabla 25- Relaciones de varianza, Cepa BALB/c, comparación entre grupos control y refugio.....	133
Tabla 26- Relaciones de varianza, Cepa BALB/c, comparación entre grupos refugio y juguete.....	134
Tabla 27- Conducta acicalamiento, StockSwiss, resumen estadístico de grupos..	136
Tabla 28- Conducta acicalamiento, StockSwiss, comparación entre grupos.....	136
Tabla 29- Conducta orinar, StockSwiss, resumen estadístico de grupos.....	137

Tabla 30- Conducta orinar,StockSwiss,comparación entre grupos.....	137
Tabla 31- Conducta defecar,StockSwiss,resumen estadístico de grupos.....	138
Tabla 32- Conducta defecar,StockSwiss,comparación entre grupos.....	138
Tabla 33- Conducta freezing,StockSwiss,resumen estadístico de grupos.....	139
Tabla 34- Conducta freezing,StockSwiss,comparación entre grupos.....	140
Tabla 35- Conducta desplazamiento por el borde VV, StockSwiss,resumen estadístico de grupos.....	140
Tabla 36- Conducta desplazamiento por el borde VV, StockSwiss,comparación entre grupos.....	141
Tabla 37- Conducta desplazamiento por el borde OO,StockSwiss,resumen estadístico de grupos.....	142
Tabla 38- Conducta desplazamiento por el borde OO,StockSwiss,comparación entre grupos.....	142
Tabla 39- Conducta exploración olfateo,StockSwiss,resumen estadístico de grupos.....	143
Tabla 40- Conducta exploración olfateo,StockSwiss,comparación entre grupos.....	144
Tabla 41- Conducta exploración sobre miembros posteriores,StockSwiss,resumen estadístico de grupos.....	145
Tabla 42- Conducta exploración sobre miembros posteriores,StockSwiss,comparación entre grupos.....	145
Tabla 43- Conducta desplazamiento por el centro,Stock Swiss,resumen estadístico de grupos.....	146
Tabla 44- Conducta desplazamiento por el centro,Stock Swiss,comparación entre	

grupos.....	146
Tabla 45 -Relaciones de varianza,StockSwiss,comparación entre grupos control y juguete.....	148
Tabla 46- Relaciones de varianza,StockSwiss, comparación entre grupos control y refugio.....	148
Tabla 47- Relaciones de varianza,StockSwiss,comparación entre grupos refugioy juguete.....	149
Tabla 48- Corticosterona,CepaBALB/c, resumen estadístico de grupos.....	152
Tabla 49- Corticosterona,CepaBALB/c,comparación entre grupos.....	152
Tabla 50 - Corticosterona, StockSwiss, resumen estadístico de grupos.....	153
Tabla 51- Corticosterona, StockSwiss, comparación entre grupos.....	153

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Relación entre el sistema nervioso central con el sistema nervioso autónomo y el sistema neuroendocrino.....	77
Figura 2. Flujograma de las actividades.....	103
Figura 3. Rack ventilado Lab.Products.....	106
Figura 4. Caja con enriquecimiento ambiental juguete.....	107
Figura 5. Caja con enriquecimiento ambiental refugio.....	107
Figura 6. Campo abierto.....	108
Figura 7. Caja control sin enriquecimiento ambiental.....	110
Figura 8. Grupos experimentales F0 y F1 Cepa BALB/c.....	118
Figura 9. ANOVA Simple, Acicalamiento, Cepa BALB/c, F0.....	120
Figura 10. ANOVA Simple, Acicalamiento, Cepa BALB/c, F1.....	120
Figura 11. Kruskal Wallis, Orinar, Cepa BALB/c, F0.....	121
Figura 12. Kruskal Wallis, Orinar, Cepa BALB/c, F1.....	122
Figura 13. ANOVA Simple, Defecar, Cepa BALB/c, F0.....	123
Figura 14. ANOVA Simple, Defecar, Cepa BALB/c, F1.....	123
Figura 15. ANOVA Simple, Freezing, Cepa BALB/c, F0.....	124
Figura 16. Kruskal Wallis, Freezing, Cepa BALB/c, F1.....	124
Figura 17. ANOVA Simple, Desplazamiento por el borde VV, Cepa BALB/c, F0....	126
Figura 18. ANOVA Simple, Desplazamiento por el borde VV, Cepa BALB/c, F1...	126
Figura 19. Kruskal Wallis, Desplazamiento por el borde OO, Cepa BALB/c, F0....	128
Figura 20. Kruskal Wallis, Desplazamiento por el borde OO, Cepa BALB/c, F1.....	128
Figura 21. ANOVA Simple, Explora olfatea, Cepa BALB/c, F0.....	129

Figura 22. ANOVA Simple, Explora olfatea, Cepa BALB/c, F1.....	129
Figura 23. Kruskal Wallis, Explora sobre miemb.posteriores, Cepa BALB/c,F0....	131
Figura 24. Kruskal Wallis, Explora sobre miemb.posteriores, Cepa BALB/c,F1....	131
Figura 25. Kruskal Wallis, Desplazamiento por el centro, Cepa BALB/c, F0.....	132
Figura 26. Kruskal Wallis, Desplazamiento por el centro, Cepa BALB/c, F1.....	132
Figura 27. Grupos experimentales F0 y F1 StockSwiss.....	135
Figura 28. ANOVA Simple, Acicalamiento, StockSwiss, F0.....	136
Figura 29. ANOVA Simple, Acicalamiento, StockSwiss, F1.....	137
Figura 30. Kruskal Wallis, Orinar, Stock Swiss, F0.....	138
Figura 31. Kruskal Wallis, Orinar, StockSwiss, F1.....	138
Figura 32. ANOVA Simple, Defecar, StockSwiss, F0.....	139
Figura 33. ANOVA Simple, Defecar, StockSwiss, F1.....	139
Figura 34. Kruskal Wallis, Freezing, StockSwiss, F0 y F1.....	140
Figura 35. ANOVA Simple, Desplazamiento por el borde VV, StockSwiss, F0.....	141
Figura 36. ANOVA Simple, Desplazamiento por el borde VV, StockSwiss, F1.....	141
Figura 37. ANOVA Simple, Desplazamiento por el borde OO, StockSwiss, F0.....	143
Figura 38. ANOVA Simple, Desplazamiento por el borde OO, StockSwiss, F1.....	143
Figura 39. ANOVA Simple, Explora olfatea, StockSwiss, F0.....	144
Figura 40. ANOVA Simple, Explora olfatea, Stock Swiss, F1.....	144
Figura 41. ANOVA Simple, Explora sobre miemb.posteriores, Stock Swiss, F0...	145
Figura 42. ANOVA Simple, Explora sobre miemb. posteriores, StockSwiss, F1...	146
Figura 43. Kruskal Wallis, Desplazamiento por el centro, StockSwiss, F0.....	147
Figura 44. ANOVA Simple, Desplazamiento por el centro, StockSwiss, F1.....	147

Figura 45. ANOVA de Dos Vías. Valores de Corticosterona comparación entre BALB/c y Swiss.....150

Figura 46. Kruskal Wallis,Corticosterona, Cepa BALB/c, F0.....151

Figura 47. Kruskal Wallis,Corticosterona, Cepa BALB/c,F1.....152

Figura 48. ANOVA Simple,Corticosterona,StockSwiss, F1.....153

RESUMEN

El enriquecimiento ambiental constituye una forma de mejorar el bienestar de los animales de experimentación. En muchos países, el enriquecimiento del ambiente en los bioterios es una exigencia respaldada por una legislación; en Argentina esta temática está parcialmente desarrollada. El bienestar brinda a los animales en cautiverio la posibilidad de expresar la mayor parte de su comportamiento específico preservando su salud y permitiendo obtener resultados confiables cuando se los utiliza como modelos. Hay mucha bibliografía al respecto en favor del enriquecimiento en animales de experimentación, en zoológicos y granjas, pero muchos autores argumentan que enriquecer el ambiente de los animales bajo experiencia, altera las condiciones estandarizadas de alojamiento y aumenta las variables; y en consecuencia modifica los resultados de las investigaciones.

En contraposición, otros autores consideran que un animal criado en un ambiente enriquecido se ve favorecido para desarrollar todas sus características comportamentales y también para no alterarse ante cambios inesperados; dando respuestas más uniformes, disminuyendo las variables experimentales y permitiendo utilizar menor número de animales. Hay pocos estudios en ratones que consideran este tema, por lo tanto el objetivo de este estudio es analizar las varianzas de los parámetros fisiológicos y del comportamiento en esta especie criados con y sin enriquecimiento ambiental respectivamente.

Palabras clave:

Bienestar, comportamiento, enriquecimiento ambiental, ratón, campo abierto.

SUMMARY

Environmental enrichment is a way to improve experimental animal welfare. In many countries, environmental enrichment in laboratory animal housing is a requirement supported by legislation. Nevertheless, this subject is not completely developed in Argentina. Welfare allows animals in captivity to express most of their specific behaviors, improved their health and consequently get reliable results when they are used as animal models. There is much literature in favor of animal enrichment in zoos, farms and experimental animals, however, some authors argue that keeping experimental animals under environmental enrichment programs, alters housing standard conditions by increasing the number of variables; and modifies the experimental results.

In contrast, other authors consider that an animal reared in an enriched environment is favored to develop all its behavioral characteristics and also not be altered due to unexpected changes; giving the chance to get uniform responses, reducing variables and the number of animals. There are few studies in mice about this topic; therefore the objective of this study is to analyze the variances of physiological parameters and behavior in this species with and without environmental enrichment servants respectively.

Key words:

Welfare, behavior, environmental enrichment, mouse, open field.

EL EFECTO DEL ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL SOBRE LA VARIABILIDAD DE PARÁMETROS FISIOLÓGICOS Y CONDUCTUALES EN RATONES DE LABORATORIO

1. INTRODUCCION

1.1 INTRODUCCION A LA CIENCIA DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO

La ciencia del animal de laboratorio se puede definir como una rama multidisciplinaria dentro de las ciencias biológicas que se ocupa del estudio de todos aquellos aspectos que contribuyen al empleo humanitario de los animales en investigación biomédica y a la obtención de resultados válidos, reproducibles, confiables y comparables. En ella se incluye el estudio de la biología de los animales de experimentación, su comportamiento, su manejo como así también de los requerimientos ambientales y de enriquecimiento para el alojamiento. Asimismo, contempla todos los aspectos relacionados con el bienestar animal, la estandarización sanitaria y genética, la prevención y tratamiento de enfermedades, y el refinamiento de las técnicas experimentales, incluidas aquellas destinadas al alivio y tratamiento del dolor como la analgesia, anestesia y la eutanasia. Esta ciencia también incluye el estudio de los aspectos éticos y legales que competen a la experimentación animal junto con la búsqueda de procedimientos alternativos y complementarios que respondan al reemplazo enunciado en el principio de las 3 erres de Russell y Burch (Van Zutphen, y col. 1993; Tuffery A. 1995).

Algunos investigadores ven como un exceso llamar ciencia a lo que es en realidad la aplicación a un caso específico los enfoques y métodos provenientes de otras disciplinas que, a su modo de ver son ciencias (Ferrari, H, 2010).

Se fundamentan en el hecho de que al abordar el bienestar de los animales, incluso los de laboratorio, no se emplean teorías o metodologías específicas, sino las que se abducen de otros campos, llamando a este escenario problemática. De todas formas en este trabajo todas las afirmaciones que se hacen son válidas ya sea que consideremos a los animales de laboratorio el objeto de una ciencia específica, o una problemática abordable desde distintas disciplinas.

Sin embargo se debe aclarar que la ciencia de animales de laboratorio se nombra y considera como tal en el contexto mundial y según los estándares internacionales.

El término “experimento con animales” puede aplicarse a cualquier procedimiento científico en el que se utilicen animales, con independencia de que sean vertebrados o invertebrados, estén en laboratorios o en ambientes menos restringidos. La mayoría de los conceptos que surgirán de esta tesis doctoral aplica a los experimentos con animales que se llevan a cabo en el ámbito de la ciencia agropecuaria, veterinaria, biológica, biomédica y la industria farmacéutica y laboratorios de ensayos de control de calidad. Con frecuencia, en la biología, las ciencias veterinarias y agropecuarias, los ensayos se diseñan con el objeto de recabar información relevante o significativa para el animal o para las especies animales con las que se ha llevado a cabo el experimento. Sin embargo, en la investigación biomédica y en los controles de calidad, el animal se emplea casi

siempre como modelo experimental para transpolar resultados al hombre. (Zúñiga J. y col.2001).

El objetivo principal de la ciencia del animal de laboratorio es contribuir con la calidad de la experimentación animal y el bienestar de los mismos.

Durante el siglo XX, la naturaleza de la relación existente entre los seres humanos y los animales se ha modificado de forma considerable. En la historia reciente, se utilizaba el ganado para proporcionar alimento, ropa y trabajo. Por medio de un proceso de domesticación gradual, los animales salvajes se han convertido en animales domésticos y más tarde incluso en animales de compañía. Este proceso ha tardado muchos siglos en desarrollarse. Por regla general, los primeros animales utilizados para fines experimentales procedían de las especies domesticadas: cerdos, perros, gatos, pollos, conejos, etc. Esto era inevitable: era de estos animales que necesitábamos información, para utilizarlos mejor. La industrialización de la segunda mitad del siglo XIX produjo un importante cambio en la relación tradicional que existía entre los animales y el hombre.

Con el inicio de la agricultura y ganaderías intensivas y la reproducción específica de animales para fines experimentales, se modificaron con rapidez tanto las condiciones de alojamiento como de cuidado. Durante las últimas décadas los cambios en el tamaño, y la estructura de los sistemas de alojamiento junto con la densidad y la composición de los grupos son de tal envergadura que los animales suelen presentar problemas para adaptarse a estas condiciones. Con frecuencia, los sistemas de alojamiento modernos para los animales de granja y experimentación hacen aparecer anomalías en su conducta y fisiología, debido sobre todo al hecho

de que estas condiciones microambientales no satisfacen las necesidades mínimas de bienestar de los animales.

El mantener los animales en un estado de bienestar óptimo es una obligación moral del hombre. Desarrollaremos más adelante qué es, y como se manifiesta en nuestro campo, la problemática del bienestar animal.

Además, desde un punto de vista práctico es esencial evitar un sufrimiento intenso a los animales durante la experimentación, puesto que puede alterar los resultados experimentales. (Foster H. y col. 1982).

Teniendo esto en cuenta, existen directivas y reglamentaciones como la CEE, cap. 2, art 5, CIOMS – ICLAS Principles, NRC Guide for the care and use of laboratory animals, FELASA Guidelines for veterinary care of laboratory animals y la CCAC Guide for the care and use of experimental animals que se han elaborado y redactado respecto a la protección y el bienestar de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos, afirmando que a todos los animales experimentales se les deberá proporcionar alojamiento y medio ambiente adecuado, libertad de movimiento apropiada, alimento, agua de bebida y los cuidados necesarios para garantizar su salud y bienestar. Cualquier restricción de las necesidades fisiológicas del animal o de sus necesidades etológicas debería limitarse a las inevitables, sin que desnaturalicen el experimento. Por lo tanto es de vital importancia tener un conocimiento detallado de la biología de las distintas especies animales que se están utilizando y sobre las cuales aún existen muchas incertidumbres y falta de conocimiento suficiente sobre estos aspectos.

Cabría preguntarse cuáles de los requisitos ambientales son esenciales y hasta qué punto se ven afectados la conducta, la fisiología y el bienestar cuando se priva a los animales de algunas de sus necesidades.

Desde mi ámbito laboral, he desarrollado mi formación en la Cátedra de Animales de Laboratorio y Bioterio, actualmente Laboratorio de Animales de Experimentación(LAE) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

Este ámbito laboral se originó en el curso que sobre animales de laboratorio dictaban docentes de la Cátedra de Anatomía de esta facultad, el mismo correspondía a una de las materias de la Carrera de Bacteriología Clínica e Industrial, creada en el año 1930, transformada hoy en Microbiología Clínica e Industrial y conservando el curso mencionado.

En esos momentos en Argentina se desarrollaban actividades en las que se usaban animales de laboratorio, dando cuenta de ello el trabajo de Bernardo Houssay (Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1947) y más adelante el de Luis Leloir (Premio Nobel de Química en 1970). Sin embargo, hasta hace pocos años a nuestro país le fue muy difícil actualizar los nuevos lineamientos sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación. Durante ese período se vivió una especie de anarquía en lo que respecta al uso y cuidado de los animales usados en investigaciones, ensayos y pruebas de diagnóstico.

Es en el año 1989, con la caída del muro de Berlín y con la desaparición del bloque comunista de la Unión Soviética en el año 1991 que comienza una nueva

etapa en el mundo llamada globalización. Es entonces cuando Argentina se ve en la necesidad de sumarse al contexto mundial incluyendo la consideración de los principios y recomendaciones internacionales para el cuidado y uso de los animales de experimentación, factor clave para la jerarquización de las investigaciones biomédicas que utilizaban modelos animales en el país.

Coincidentemente, en el año 1992 se inaugura el bioterio de la FCV UNLP, como parte de un proyecto de desarrollo financiado por la JICA (Agencia de Cooperación Internacional de Japón). El mismo contó desde sus inicios con características edilicias y de equipamiento acordes con los estándares internacionales, desarrollando hasta la actualidad actividades docentes, de investigación y servicios a terceros. La puesta en marcha de este bioterio, destinado a la producción de diferentes cepas de ratas y ratones de calidad sanitaria y genética certificada, acompaña desde sus inicios los avances que se han producido en esta temática en el país. El desarrollo de normativas y comités de ética para la experimentación con animales así como la legislación específica, surgidos como necesidad ante las controversias que aun hoy acompañan estas actividades, es uno de los temas centrales en nuestro medio. La calidad de los modelos animales, la aplicación correcta de los principios de reducción, refinamiento y reemplazo; la educación de técnicos y usuarios, el diseño de instalaciones y manejo de equipamiento, son algunos de los aspectos que impactarán sobre el bienestar de los animales.

Desde hace aproximadamente seis años se ha producido un cambio de paradigma en la ciencia de los animales de laboratorio el cual propone tener en cuenta aspectos relacionados con el comportamiento y por ende con el bienestar del

animal sometido a algún tipo de procedimiento. En ese sentido el enriquecimiento ambiental se considera como un componente del programa del cuidado del animal. Esta posición, que incluye la descripción y el conocimiento de los comportamientos y necesidades de cada especie, hace necesario al mismo tiempo, medir el impacto e influencia del enriquecimiento en el resultado científico. En este sentido se hace ineludible desarrollar estudios sobre la evaluación de programas de enriquecimiento en animales de experimentación.

Del total de los animales de experimentación utilizados para el descubrimiento de nuevos avances biomédicos y de importancia para la humanidad, los roedores son el orden más importante, formado por unas 1800 especies, y constituyen el 80 % del total de animales usados. Y dentro de este orden el ratón es la especie que sigue a la vanguardia en tales hallazgos ocupando el 95% en preferencia, seguido por la rata y luego el resto de los roedores. Esta, junto con la facilidad de disponer de diferentes cepas, el equipamiento necesario y aportar al conocimiento científico acerca del comportamiento y los beneficios del enriquecimiento son algunas de las razones que ampliamente justifican la elección como modelo para realizar este trabajo (Zúñiga J. y col. 2001, Van Zutphen y col. 1993).

1.2 ESTANDARIZACIÓN DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO

Los animales de laboratorio, como reactivos biológicos vivos, deben ser estandarizados genética y sanitariamente, para que los resultados de las experiencias sean confiables (Foster H. y col. 1981, 1982, 1983).

El control del estado de salud y de la condición genética de los animales de experimentación que se utilizan como reactivos biológicos es la base y el

fundamento para la obtención de resultados confiables, reproducibles y comparables en las pruebas de diagnóstico, investigación y controles de calidad, en las que se requiera el uso de los mismos (Benavidez F., Guénet J.L, 2005).

Aplicando los procedimientos que establecen los estándares internacionales se puede cumplir con los objetivos generales de incrementar la calidad, reducir el número, reemplazar los animales en las experiencias y brindarles bienestar. De esta manera se evitará la repetición de los ensayos ya que esto genera un gasto importante de dinero, de tiempo, y sobre todo una falta de responsabilidad desde el punto de vista ético y moral por el hecho de estar trabajando con seres vivos (UFAW, 2010).

El uso de animales con estado de salud deficiente o no controlada, o de pureza genética desconocida, o animales mantenidos en condiciones de no bienestar conduce inevitablemente a la obtención de resultados erróneos, imprecisos, y poco o nada generalizables (Martino P., 2007). En diversos países de nuestro continente, incluyendo el nuestro, se puede admitir que esto es bastante común por lo que los resultados que se obtienen al emplear animales serían poco confiables y comparables.

En algunas ocasiones se crían y utilizan animales de laboratorio que potencialmente albergan microorganismos patógenos sin que se preste mayor importancia a su estatus microbiológico. Debido a la resistencia innata adquirida, estos no siempre muestran signos clínicos por lo que estas infecciones inaparentes pueden conducir a errores de interpretación de los resultados experimentales (Coates M. & Gustafsson B. 1984).

Los animales portadores de dichas contaminaciones pueden causar brotes epizooticos en los bioterios; por lo tanto el diagnóstico y la detección de estos microorganismos se han convertido en el objeto primario del control sanitario de los animales de laboratorio (ICLAS, 1964, NIH, Manual of Microbiología, 1994).

De la misma manera, un animal no definido genéticamente también conducirá a la obtención de resultados no comparables e irá en contra del principio de las 3Rs (reducción del número de animales, reemplazo por otros métodos y refinamiento de las técnicas experimentales) por lo que es indispensable asegurarse de emplear siempre animales definidos desde el punto de vista sanitario y genético (Lyon M. 1989; Hedrich H. 1990).

Toda experimentación con animales de laboratorio utilizados como modelos, exige que se controlen al máximo las variables ya comentadas como así también las macro y micro ambientales y de manejo; de manera de evitar que estos factores interfieran con los resultados de las experiencias (Svendesen & Jan Hau. 1994), por lo cual los distintos elementos que integran dichas variables deben ser conocidos y controlados.

Esta visión de los animales como reactivos biológicos tiene una ventaja y una desventaja. La ventaja es que propone que se homologuen a “nivel de reactivo puro” las condiciones indispensables que debe reunir para comportarse como tal, es decir, su calidad y pureza, por eso la estandarización genética, sanitaria y de manejo es fundamental. El aspecto negativo del término reactivo, es que al definirlo como insumo, algo que se transforma, no se espera que tenga más necesidades que su mera preservación de manera que sea útil a nuestros objetivos. No se pregunta por

el bienestar del ácido acético glaciario, o por los estados afectivos del potasio. Este término, al invisibilizar la diferencia cualitativa entre el ratón y la droga que se le inyecta, habilita una vía simbólica hacia la desensibilización de los operadores respecto de sus animales.

1.3 EL AMBIENTE DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO

Una instalación para animales de laboratorio (bioterio) debe facilitar la investigación mediante la disminución de variables experimentales imprevistas, mientras provee todos los requerimientos fisiológicos, sociales y de comportamiento del animal. Existen proyectos de investigación diferente, y/o especies diferentes de animales, que requieren a menudo ambientes, manejos e instalaciones distintos. Para satisfacer tales necesidades, un bioterio debe tener áreas separadas para diversas funciones, salas y equipo especializados, y condiciones ambientales controladas. (Dean S.W., 1999).

Existen factores físicos, químicos y biológicos que influyen sobre los animales de experimentación y modifican los resultados de las investigaciones. Estos son, en principio, válidos para las condiciones en las cuales se obtuvieron y útiles para la comparación, solamente si está disponible toda la información pertinente relativa a las condiciones experimentales.

Para su mayor comprensión el ambiente de los animales de experimentación puede dividirse en dos: el macroambiente y el microambiente.

El macroambiente es el espacio físico donde se alojan el conjunto de jaulas para mantener los animales, mientras que el microambiente es el espacio inmediato que

rodea a los animales y está limitado por el perímetro de la caja o jaula. Cada uno tiene particularidades que se detallan a continuación.

1.4 MACROAMBIENTE

Es el ambiente físico donde se alojan los animales y lo integran una serie de factores que se denominan variables ambientales los cuales deben ser controlados. Entre estos, se encuentran: la temperatura (°C y variaciones), la humedad relativa (% y variaciones), la ventilación, la iluminación (natural y/o artificial, el fotoperiodo, y la intensidad); los ruidos y los olores.

Control del macroambiente

Las exigencias ambientales varían según la especie animal y el protocolo experimental. No son pocas las veces en que se producen contradicciones entre ambos requerimientos, y es función del personal, quien gestiona el bioterio, solucionarlas adecuadamente o indicar los cambios que se requieren.

Los parámetros del ambiente están habitualmente evaluados a nivel del local de alojamiento. Sin embargo, es importante considerar el microambiente de la caja, porque las condiciones entre este y el macroambiente pueden variar considerablemente. Ciertos datos disponibles indican que la temperatura, la humedad, la concentración de gases y determinadas partículas son más elevadas en el microambiente que en el macroambiente (Besch 1980; Hasenau y col. 1993; Perkins and Lipman 1995; E. Smith y col. 2004), mientras que los niveles de iluminación son generalmente más bajos. Además, los roedores son quienes generan y regulan su microambiente, tanto en su ambiente ancestral de selección, en los

antropizados que han colonizado y en los laboratorios. Esta regulación que ejercen los roedores se concreta mediante la construcción de madrigueras, y la realización de conductas específicas.

El diseño de la instalación para los animales debe permitir ajustar los mecanismos de control del ambiente, a fin de cumplir con las necesidades de las especies y el protocolo experimental correspondiente. Cada sala en la cual se alojan debe contar con un sistema de control ambiental. En instalaciones que no han sido construidas específicamente para albergar animales, y que no cuenten desde el punto de vista del equipamiento, con un sistema que permita realizar el control del ambiente, es posible llevarlo a cabo mediante un manejo apropiado, instalar cronómetros automáticos de iluminación, reóstatos, ventiladores de extracción con control termostático, humidificadores, y unidades de aire acondicionado.

Temperatura

Los datos publicados en literatura de referencia sobre temperaturas óptimas para alojar animales de laboratorio son variables (CCAC, 1984; Clough, 1984; NRC, 1985). En este trabajo se toman en cuenta las directrices del Consejo de Europa (European Convention, 1986).

TABLA 1- Relación de temperatura y humedad relativa entre las distintas especies de animales de laboratorio

	TEMPERATURA	H R%
ESPECIES(peso)	Sala/Jaula °C	(Humedad relativa)
RATÓN	22-25	50-70
RATA	20-25	50-55

Los animales deben ser alojados y mantenidos dentro de un rango de temperatura apropiada para la cual se adaptan con mínimo estrés y alteración fisiológica. El mantenimiento de la temperatura corporal dentro de su variación circadiana normal es necesario para su bienestar. La zona termo neutral es el rango de temperatura donde se produce la termorregulación, sin necesidad de que un animal incremente su producción metabólica de calor o active los mecanismos de pérdida de calor por evaporación (Gordon 2005). Para mantener la temperatura del cuerpo en un ambiente determinado los animales ajustan su comportamiento y su fisiología. Por ejemplo, en los ratones la zona termoneutral ronda entre 26°C y 34°C (Gordon 1993); por lo que a temperaturas más bajas, construyen nidos y se acurrucan para descansar y dormir permitiéndole termorregular por comportamiento y controlar su microambiente. Por el contrario, prefieren temperaturas por debajo de los 26°C para sus periodos de actividad (Gaskill y col. 2009; Gordon 2004; Gordon y col. 1998).

La temperatura ambiente en un cuarto para roedores debe estar ajustada siempre por debajo de su límite crítico inferior para evitar estrés por calor. Esto lleva a proveerle materiales o estructuras para que puedan termorregular (nidos, túneles, etc.) y evitar el estrés por frío.

Es esencial que existan equipos de emergencia disponibles para mantener las temperaturas ambientales, particularmente en salas que alojan animales pequeños de laboratorio, peces, y primates no humanos (PNH). En casos especiales, por ejemplo, cuando se alojan animales muy jóvenes o sin pelo (ratones), es necesario mantener temperaturas más altas que las sugeridas.

Las temperaturas en las salas de los animales deben ser controladas diariamente y, preferentemente, registradas durante las 24 horas del día. Si las prácticas de manejo o el protocolo experimental requieren que un animal sea alojado a temperaturas fuera de las recomendadas, se le debe dar el tiempo necesario para adaptarse (Baker, Lindsey y Weisbroth, 1979). La temperatura del microambiente deberá igualmente ser controlada. Los factores que afectan la temperatura en la caja/jaula incluyen el tipo y material de la caja, del lecho y del nido, el uso de tapas filtros, como también la especie, la edad, el sexo, la cepa de los animales, y la densidad de alojamiento (Woods, 1980; Corning, 1992).

Las temperaturas ambientales y sus variaciones son muy importantes ya que pueden afectar la investigación y las pruebas con los animales, hasta llegar a influir en la respuesta de los mismos a determinadas drogas, en la susceptibilidad a enfermedades infecciosas, la fertilidad, la reproducción, la ingesta de agua y de alimentos, las curvas de crecimiento, y los parámetros hematológicos (Baker, Lindsey y Weisbroth, 1979; Lindsey, 1978; Yamauchi, 1981). Ocasionalmente, la temperatura óptima para el animal de experimentación no es la más cómoda para el personal; sin embargo, las preferencias humanas no deberían comprometer los requerimientos experimentales o la salud y comodidad del animal.

Humedad

La mayoría de los animales de laboratorio requieren una humedad relativa alrededor de 50%, pero pueden tolerar variaciones de +/- 20% mientras sea de manera relativamente constante y que las variaciones de temperatura sean adecuadas (Clough, 1987). Es importante considerar que cuando los niveles de

humedad no permiten que los animales logren controlar y mantener su homeostasis térmica esto resulta en un malestar que puede afectar su bienestar. En las instalaciones donde es difícil de controlar la humedad dentro de variaciones aceptables, es necesario instalar deshumidificadores o humidificadores.

Los niveles de humedad afectan los resultados experimentales, influyendo en la regulación de la temperatura, el desempeño del animal, y la susceptibilidad a las enfermedades. Numerosos estudios han demostrado que tanto los porcentajes altos como los bajos de humedad incrementan la tasa de mortalidad en ratones predestete(Clough 1982).

En los sistemas de cajas con tapa filtro para roedores, la humedad relativa del microambiente puede aumentar las concentraciones tanto de amonio como de amoniaco (Corning and Lipman 1991; Hasenau y col. 1993) lo que a su vez puede provocar irritaciones de las fosas nasales y alterar alguna respuesta biológica (Gordon y col. 1980; Manninen y col. 1998).

Ventilación

El propósito principal de la ventilación es proveer buena calidad de aire y condiciones ambientales estables. Específicamente ésta debe proveer oxígeno, remover la carga térmica producida por los animales, el personal, los equipos y las luces, diluir las partículas gaseosas y contaminantes incluidos los alergenos y patógenos que se dispersan en el aire, permitir ajustar la temperatura y la humedad del cuarto y de ser posible crear presiones diferenciales entre espacios adyacentes.

El diseño del sistema de ventilación del edificio debe permitir el mantenimiento de estos parámetros dentro de límites aceptables. El índice requerido de circulación de aire varía según diferentes factores, principalmente la edad de los animales, el sexo, la especie, la densidad de la población, la frecuencia de la limpieza, la calidad del aire que entra desde el exterior, la humedad y la temperatura del medio, y el diseño del macro y microambiente.

Se recomienda usualmente una frecuencia de 15 -20 cambios de aire por hora (sin corrientes de aire) para salas alojando animales pequeños de laboratorio en condiciones convencionales; esto permite obtener aire de buena calidad, con un volumen constante y asegurar un microambiente con buena calidad de aire (Clough, 1984). Sin embargo, tal frecuencia no garantiza la ventilación adecuada al nivel de la caja, particularmente si se usan tapas filtros (Keller, White, Sneller y col. 1989).

Este régimen de ventilación puede, en algunas circunstancias, provocar una sobreventilación en macroambientes con pocos animales y generar un derroche de energía o una subventilación en macroambientes con muchos animales y provocar un incremento del calor y la humedad, y además generar contaminantes en la sala. Los equipos con ventilación individual de cada caja y los locales con flujo laminar proveen una buena ventilación con una circulación de aire unidireccional sin demasiadas corrientes o torbellinos de aire. Estos sistemas pueden aislar eficientemente las cajas entre ellas y controlar la diseminación de olores y agentes patógenos transportados en el aire (Phillips y Runkle, 1973; McGarrity y Coriell, 1976).

Las diferencias de presión de aire pueden usarse para inhibir el pasaje de agentes patógenos entre salas. Las presiones más altas se usan en áreas limpias unidas con áreas sucias o con riesgos biológicos, a fin de minimizar las contaminaciones (Hessler y Moreland, 1984). En las instalaciones donde el confinamiento y la exclusión de microorganismos dependen en parte de las diferencias de presión de aire, se pueden utilizar manómetros o varillas graduadas inclinadas para medir la diferencia entre las presiones altas y bajas en milímetros de agua. Generalmente, se debe mantener una diferencia de 2.5-5.0 mm (Small, 1983).

El diseño del sistema de ventilación debe tomar en cuenta la conservación de energía (Besch, 1980). Aunque sean preferibles los sistemas que cambian el aire, no son especialmente económicos en regiones con temperaturas extremas (Hessler, 1984). Los sistemas de recirculación de aire deben ser dotados de filtros eficaces con 85 – 95 % ASHRAE y de depuradores de aire, si fueran necesario, para evitar la diseminación de enfermedades y quitar partículas y contaminantes gaseosos (p. ej., NH_3) (Hessler, 1984, NAFA 1996).

Iluminación

Los tres factores de la iluminación que pueden influir sobre los animales de laboratorio son: la intensidad, la calidad, y el fotoperiodo. La iluminación debe proveer una buena visibilidad y brindar una luz uniforme y sin reflejos. La luz puede afectar la fisiología, la morfología y el comportamiento de los animales (Azar y col. 2008; Brainard y col. 1986; Erkert and Grober 1986; Newbold y col. 1991; Tucker y col. 1984).

Los fotoestresores más importantes son el fotoperiodo, la fotointensidad y la calidad del espectro de la luz inapropiada (Stoskopf 1983).

El nivel recomendado de unos 300 lux aproximadamente a 1m del piso es aceptado como para desarrollar las tareas de rutina con los animales y no ocasionar retinopatía fototóxica en los roedores (Belhorn, 1980). Un nivel de aproximadamente 200 lux no parece causar daños a la retina y se ha demostrado que es adecuado para la reproducción y el comportamiento social normal entre la mayoría de los roedores (Weihe, 1976). A este nivel, es necesario contar con una fuente de iluminación adicional controlada por un interruptor separado con el objeto de mejorar la iluminación durante las actividades de mantenimiento.

La intensidad luminosa experimentada por animales alojados cerca de la fuente puede diferir notablemente con la que experimentan otros más alejados, porque la intensidad es inversamente proporcional al cuadrado de la distancia de la fuente luminosa. Además, dicha intensidad dentro de una jaula depende de la construcción y del tipo, de su posición sobre el soporte, del tipo de soporte, y puede variar notablemente desde el frente hacia atrás (McSheehy, 1983). También puede influir sobre la agresividad y el canibalismo en los roedores (Weihe, 1976; Fall, 1974). Los cambios graduales entre los períodos de oscuridad y claridad dan tiempo para el ajuste del comportamiento y la expresión de conductas crepusculares.

Se ha constatado que la iluminación en las salas donde se alojan animales debería tener en la medida de lo posible las características de la luz solar. En los roedores de laboratorio, un espectro luminoso que difiera notablemente de la luz del sol puede reducir el rendimiento de la reproducción, ocasionar anomalías

del comportamiento y favorecer el desarrollo espontáneo de tumores (Weihe, 1976). Es importante tener en cuenta que comercialmente se dispone de diversos artefactos de iluminación que imitan el espectro de la luz del sol.

El fotoperiodo es probablemente el factor de la luz que influye más en los animales de laboratorio. La luz es captada por los fotorreceptores de la retina y genera impulsos nerviosos que son conducidos a distintas áreas cerebrales para su procesamiento. Entre estas áreas cerebrales, es muy importante el eje hipotálamo-hipofisario que actúa como regulador en la producción y secreción de hormonas que regulan numerosos procesos vitales como la reproducción, y otros ritmos circadianos, los cuales pueden tener influencia vital en estudios toxicológicos y farmacológicos. El ciclo circadiano puede afectar la respuesta del animal a drogas o su resistencia a organismos infecciosos inoculados (McSheehy, 1983). La relación luz - oscuridad afecta el rendimiento reproductivo y la madurez sexual. En caso de que el período de luz se interrumpa por la oscuridad, se observan pocos efectos importantes; por el contrario, si ocurre al inversa, los ritmos endógenos pueden afectarse significativamente (Davis, 1978). Eso es una razón para instalar relojes automáticos destinados a regular los ciclos de luz en todas las salas donde se alojan animales. El fotoperiodo establecido debería controlarse a través de un sistema de alarmas. Asimismo, hay que tener en cuenta que en caso de que existan ventanas en los locales donde se alojan animales, estas deben poder cerrarse totalmente. Las diferencias en la iluminación, la temperatura y el flujo de aire entre las jaulas sobre los estantes pueden afectar los resultados experimentales y por lo tanto deberían ser minimizadas. Esto es posible rotando las jaulas en diferentes posiciones sobre los

estantes, o asignando a las mismas un número basado en una tabla de números aleatorios.

Algunas especies son poco sensibles a ciertas zonas del espectro luminoso; por lo tanto en algunos laboratorios, cuando deben realizarse manipulaciones durante el horario de oscuridad, se emplean luces con longitudes de onda que no perturben a los animales. (Berson DM y col. 2002).

También es deseable establecer sistemas de encendido y apagado progresivo de los distintos puntos de luz de las salas de los animales, con el fin de evitar el efecto negativo que podría tener un paso instantáneo de la fase oscura a la luz y viceversa (Zúñiga J. y col. 2001)

Ruido

Los efectos del ruido sobre los animales de laboratorio dependen de la intensidad, frecuencia, rapidez de aparición, duración y también de las características del animal (especies, cepa, antecedentes de exposición al ruido). La sensibilidad y susceptibilidad al ruido que conduce a la sordera difiere según la especie. La exposición prolongada a niveles altos de ruido puede ocasionar lesiones auditivas. La exposición a patrones uniformes de estímulo puede conducir más rápidamente a la pérdida del oído, mientras que la exposición a patrones irregulares probablemente ocasione desórdenes debidos a la activación repetida del sistema neuroendócrino (Peterson, 1980).

Un ruido intenso puede ocasionar alteraciones en los sistemas gastrointestinal, inmunológico, reproductivo, nervioso, y cardiovascular, como así también cambios

en el desarrollo, el nivel de hormonas, la estructura suprarrenal, el número de células sanguíneas, el metabolismo, el peso de los órganos, la ingestión de alimentos y el comportamiento (Agnes, Sartorelli, Abdi y col. 1990; Bailey, Stephens y Delaney, 1986; Fletcher, 1976; Kraicer, Beraud y Lywood, 1977; Nayfield y Besch, 1981; Pfaff, 1974; Gerber y Anderson, 1967).

Los ruidos intensos y súbitos pueden provocar sobresaltos y acelerar la aparición de crisis epileptiformes en varias especies y cepas de animales de laboratorio (Iturrian, 1971; Pfaff, 1974). Además se ha confirmado que la emisión de ultrasonidos pueden ocasionar perturbaciones al comportamiento en una variedad de especies (Algers, 1984). Aunque no se establecieron criterios firmes para la tolerancia al ruido en los animales de laboratorio como se hizo para el hombre (Falk, 1973; Welch y Welch, 1970), se puede presumir que ruidos innecesarios y excesivos constituyen una variable experimental importante y un peligro posible para la salud. Se considera apropiado que en las salas el ruido no sea superior a los 50 dB.

El ruido se puede controlar en los bioterios mediante un diseño y construcción apropiados, una selección atenta del equipo, buenas prácticas, mediciones regulares y manejo adecuado. Los animales naturalmente ruidosos deben ubicarse donde no molesten a las especies más tranquilas y sensibles al ruido. Las alarmas de incendio que operan a baja frecuencia son perceptibles por el hombre, pero no perturban ratones y ratas. Los teléfonos no deben instalarse en las salas de los animales. En los bioterios generalmente existen elementos que emiten ultrasonidos (Sales, Wilson, Spencer y col. 1988), comocanillas que gotean y diversos mobiliarios que

chirrían, por lo tanto se deben hacer esfuerzos para identificar de donde provienen los mismos y corregirlos.

El ruido puede también perturbar o perjudicar al personal de los bioterios, los investigadores, y a otras personas que trabajan cerca. Puede ser necesario proveer protectores de tímpanos a las personas que trabajan con algunos tipos de animales tales como: perros, cerdos, monos, o en salas donde se limpian las jaulas.

1.5 MICROAMBIENTE

Es el espacio inmediato que rodea a los animales y está limitado por el perímetro de la caja o jaula. Los factores que forman parte del mismo y que deben controlarse para evitar variaciones son: el habitáculo (caja, jaula o corral), el lecho o cama, el alimento, el agua y la densidad de animales. También deberíamos incluir los productos químicos que se encuentran tanto en el micro ambiente como en el macroambiente.

Productos químicos

Los productos químicos en el ambiente suelen causar de muchas maneras problemas al animal de laboratorio. Los compuestos o metabolitos tóxicos pueden tener en si efectos locales o sistémicos sobre todas las especies. Muchos de los productos químicos que se encuentran en los bioterios son responsables de alteraciones en la actividad enzimática microsómica del hígado, también se detectaron problemas a nivel de la función inmunitaria y del comportamiento, de los alérgenos, mutagénesis, teratogénesis y carcinogénesis. Los efectos son modulados por la interacción entre factores químicos (la concentración; las propiedades

fisicoquímicas; la duración, la frecuencia y vía de exposición; la interacción con otros agentes) y factores del huésped (especie, edad, sexo, cepa, estado nutricional, función inmunitaria y estado de salud) (Baker, Lindsey y Weisbroth, 1979).

Los productos químicos llegan al micro ambiente mediante el aire, el agua, los alimentos, la cama y las superficies de contacto. Los contaminantes comunes del aire incluyen las partículas y polvo de cama, los desinfectantes con amoníaco, las feromonas, los solventes orgánicos, los anestésicos volátiles, los insecticidas, y perfumes o desodorantes.

El contaminante del aire más importante en las salas con animales es el amoníaco (NH_3) que proviene de la descomposición de residuos nitrogenados (Broderson, Lindsey y Crawford, 1976). Este causa irritación del epitelio respiratorio y aumenta la susceptibilidad de los roedores a la micoplasmosis respiratoria (Broderson, Lindsey y Crawford, 1976; Lindsey, Connor y Baker, 1978). Se ha observado que se producen cambios patológicos subclínicos en el sistema respiratorio debido al amoníaco, complican los estudios de toxicidad por inhalación en roedores de laboratorio (Gamble, 1976). En el personal, 25 ppm o menos con una exposición de 8 horas/día y 5 días/semana no tiene efectos nocivos [American Conference of Government and Industrial Hygienists Threshold Limit Value (TLV, en inglés)]. El umbral de detección del olor a amoníaco en los humanos es de 8 ppm, en comparación con un valor limitado del umbral (VLU) que es 17 mg/m^3 .

El micro ambiente del animal debe ser verificado así como también la sala, porque a menudo las condiciones difieren significativamente entre los dos (Corning y Lipman, 1992). Los niveles de amoníaco aumentan cuando los factores relacionados

con la producción de animales (especie, sexo, densidad de población, cama) exceden a aquellos que intervienen en la eliminación del amoníaco (diseño de las jaulas, cambio de aire, frecuencia de la limpieza, etc.) (Serrano, 1971). La tapa filtro que reduce el cambio de aire a nivel de la jaula, puede conducir rápidamente a concentraciones nocivas de NH_3 . Por eso su control dentro de niveles seguros requiere una atención constante de la densidad del abastecimiento de aire y la frecuencia de limpieza de la jaula.

El personal técnico y usuario de animales nunca debe usar perfumes y desodorantes para enmascarar los olores de amoníaco u otros propios de los animales, lo que se recomienda es implementar buenas rutinas de limpieza. Estas sustancias en general son nocivas para los animales (Baker, Lindsey y Weisbroth, 1979; Pakes, Lu y Meunier, 1984). Además, los anestésicos volátiles deberían usarse solamente con aparatos apropiados de depuración.

Hay que tener en cuenta que también pueden entrar en el ambiente del animal productos químicos mediante el agua. Además de la verificación de los contaminantes bacterianos y salvo en los animales acuáticos, la calidad del agua raramente se controla. Se usa habitualmente el agua clorada de los municipios. Se han detectado más de 700 compuestos orgánicos en tales fuentes (90% son productos naturales de descomposición). Estos pueden reaccionar con el cloro para producir cloroformo (Pakes, Lu y Meunier, 1984). Algunas sustancias inorgánicas, particularmente el cobre (que proviene de caños de cobre) y el cloro, son especialmente peligrosas para los organismos acuáticos.

Los alimentos pueden ser contaminados por metales pesados (p. ej., plomo, arsénico, cadmio, níquel, mercurio), por toxinas naturales (p. ej., micotoxinas, alcaloides del tizón, alcaloide de la pirolizidina, compuestos estrogénicos), por productos agrícolas químicos (p. ej., herbicidas, plaguicidas, fertilizantes), y aditivos (p. ej., antibióticos, colorantes, agentes de conservación, condimentos, drogas incorporadas involuntariamente) (Baker, Lindsey y Weisbroth, 1979; Pakes, Lu y Meunier, 1984; Silverman y Adams, 1983).

Los productos químicos que se encuentran sobre la superficie de contacto incluyen los agentes de limpieza tales como: jabones, agentes líquidos, detergentes, solventes y desinfectantes (Burek y Schwetz, 1980). Estas sustancias deben enjuagarse de las superficies con las cuales los animales entran en contacto, a menos que tengan especificado su inocuidad por parte del fabricante y que no represente ningún riesgo. La eficacia del ciclo de enjuague del lavado de las jaulas debe verificarse periódicamente para asegurarse que no queden residuos.

En cuanto al material que compone el lecho, particularmente los productos derivados de la madera, son capaces de introducir en el micro ambiente del animal aceites volátiles naturales, herbicidas, plaguicidas y agentes de conservación. Como así también otros contaminantes posibles incluyen los PCB y antibióticos (Silverman y Adams, 1983). En el caso de los hidrocarburos volátiles contenidos en la viruta de cedro y pino, es importante evitarlos ya que pueden inducir la síntesis de enzimas hepáticas microsómicas. (Weisbroth, 1979).

Lecho o Cama

Todos los animales deben tener un sustrato apropiado para descansar, dormir y desarrollar las actividades correspondientes a su comportamiento. A este sustrato se lo llama comúnmente lecho o cama. La elección de materiales para lecho para las jaulas o cajas puede influir profundamente el micro ambiente de los pequeños roedores. En la mayoría de los casos, se recomienda lecho de contacto directo con los animales ya que cuando se les da la posibilidad de elegir, los roedores prefieren pisos sólidos con lecho y no de alambre (Blom y col. 1996; Manser y col. 1995, 1996).

El lecho de contacto aumenta las posibilidades de expresar comportamiento específicos de las especies por ejemplo, escarbar, anidar, forrajear, etc., (Armstrong et al. 1998; Ivy y col. 2008) además de absorber la orina, las heces y facilitar la limpieza y sanitización. Si se provee en suficiente cantidad también facilita la termorregulación (Gordon 2004). Los animales en reproducción deben contar con material adecuado para construir el nido según los requerimientos de cada especie (ratones: Sherwin 2002; ratas: Lawlor 2002; gerbils: Waiblinger 2002).

Se debe siempre tomar en consideración el material de lecho cuando se elabora un protocolo experimental, y usar el mismo a lo largo del estudio, dada la influencia que ejerce sobre las respuestas fisiológicas y de comportamiento, su posible toxicidad y carcinogénesis. De esta misma manera los lechos no esterilizados, son una fuente posible para la introducción de microorganismos y enfermedades en las colonias de roedores. (Newman y Kowalski, 1973).

En general se utiliza como material para lecho la viruta de maderas blandas y blancas, la mazorca de maíz molida y micropellets de madera blanda.

TABLA 2 -Criterios deseables para el lecho de contacto de los roedores

CRITERIOS DESEABLES PARA EL LECHO DE CONTACTO DE LOS ROEDORES (Kraft, 1980)	
•	Absorba la humedad
•	Exenta de polvo
•	No permita el crecimiento bacteriano
•	No comestible
•	No manche
•	No ocasione traumatismos
•	Fije el amoníaco
•	Se pueda esterilizar
•	No forme productos indeseables después de la esterilización
•	Fácil de almacenar
•	No sea desecante para los animales
•	No contaminada
•	No nutritiva, desagradable al gusto, difícil de masticar o de guardar en la boca
•	No tóxica
•	No maloliente
•	Apropiada para la nidación
•	Apropiada a la incineración
•	Fácil de obtener
•	Relativamente barata
•	Resistente al fuego
•	Químicamente estable a lo largo del uso
•	Uniforme entre los lotes
•	Optimice el comportamiento normal
•	No sea perjudicial para los lavajaulas
•	No presenta peligro o riesgos para el personal

Densidad de población y limitaciones de espacio

Las necesidades de espacio para los animales son complejas y las consideraciones solo por el tamaño o la relación del peso del animal con la superficie de área disponible son insuficientes. Los argumentos para determinar el espacio incluyen: la edad, el sexo, el número de animales a coalojar y la duración del

alojamiento, la finalidad de ese alojamiento (experimentación o producción) y alguna necesidad especial que tengan (espacio aéreo). En muchos casos los animales púberes que pesan menos pueden requerir más espacio relativo que los adultos (Ikemoto & Panksepp 1992). Los animales sociales alojados en grupos pueden compartir zonas, por lo que la cantidad de espacio requerida por animal es menor a medida que se incrementa el tamaño del grupo; por lo tanto, grupos grandes pueden requerir menos espacios que los alojamientos individuales o en grupos pequeños. Pero los alojamientos sociales deben tener complejidades estructurales y espacio para permitir el escape o el escondite de sus agresores o dominantes. Los animales en reproducción requieren de mayor espacio, especialmente si son criados con varios padres en la misma caja hasta la edad del destete.

Los recintos con enriquecimientos complejos pueden aumentar las expresiones de algunos comportamientos específicos y requerir de mayor espacio para sus necesidades. Por lo tanto no hay una fórmula ideal para calcular y recomendar espacios para los animales basados solo en el tamaño y peso corporal.

Las nuevas revisiones de guías de referencia mundial (ejemplo: Guide for the Care and use of Animals 8th edition) se han diferenciado de las anteriores y han puesto el foco en otras consideraciones, como son las necesidades especie específicas, las alturas de los recintos para permitir la expresión de conductas y de posiciones posturales, el uso del espacio aéreo de la especie, e incluso el empleo de perchas que permitan al animal separar su cuerpo totalmente del suelo lo que mejora su bienestar (Clarence y col. 2006; MacLean y col. 2009).

Esta guía indica además que los comités de cuidado y uso de animales (CICUALes) de cada institución son los que deben asesorar, recomendar, revisar y modificar de ser necesario los alojamientos considerando índices de rendimiento, (por ejemplo: la salud, la reproducción, el crecimiento, la actividad, el comportamiento y el uso del espacio); además considera necesidades especiales específica de especies y/o características de cada cepa (ejemplo: obesidad, hiperactividad, etc.) y por último el uso experimental (animales en estudios de largo plazo requieren de espacios más grandes y complejos).

En cuanto al espacio destinado a objetos que se introducen en el microambiente como tolvas de agua, juguetes u otro tipo de enriquecimiento no deben considerarse como parte de la superficie disponible.

La densidad de población y el tamaño de los grupos influyen en el estado fisiológico y psicológico de los animales y pueden afectar profundamente las respuestas experimentales (Baer, 1971; Clough, 1976). La supervivencia y crecimiento de los ratones, tanto como el comportamiento maternal, pueden ser afectados negativamente por superficies de piso demasiado grandes. El comportamiento de nidación en las ratas se perturba y altera en las cajas adonde hay una gran densidad poblacional, lo que se traduce en una tendencia creciente a que las madres ignoren a los animales jóvenes y se incremente la mortalidad. La densidad puede afectar la eficiencia en la ingesta de alimentos y la incidencia de lesiones de piel (Les 1968, 1972). Por el contrario, el estrés producido por el aislamiento puede resultar en un incremento de la nerviosidad entendida como la agresividad, la susceptibilidad a convulsiones y a algunas drogas, el metabolismo y

la actividad córtico-suprarrenal (Balazs y Dairman, 1967; Hatch, Weiberg, Zawidzka y col. 1965; Moore, 1968). Siempre y cuando sea posible, el tipo de alojamiento y las densidades animales deben ser uniformes a lo largo de un estudio. Las densidades recomendadas de alojamiento se enumeran en la tabla 3.

TABLA 3 - Recomendaciones de espacio mínimo comúnmente usados en roedores de laboratorio alojados en grupo

Animal	Peso, g	Área de piso/animal,(cm ²)	Alto, (cm)	Comentarios
Ratones en grupos	<10	38.7	12.7	Animales grandes pueden requerir más espacio para alcanzar sus estándares de rendimiento
	Hasta 15	51.6	12.7	
	Hasta 25	77.4	12.7	
	>25	≥96.7	12.7	
Hembra + camada		330 (espacio recomendado para alojamiento en grupo)	12.7	Otras configuraciones reproductivas pueden requerir más espacio y pueden depender de consideraciones tales como el número de adultos y camada, y tamaño y edad de las crías
Ratas en grupos	<100	109.6	17.8	Animales grandes pueden requerir más espacio para alcanzar sus estándares de rendimiento
	Up to 200	148.35	17.8	
	Up to 300	187.05	17.8	
	Up to 400	258.0	17.8	
	Up to 500	387.0	17.8	
>500	451.5	17.8		
Hembra + camada		800 (espacio recomendado para alojamiento en grupo)	17.8	Otras configuraciones reproductivas pueden requerir más espacio y pueden depender de consideraciones tales como el número de adultos y camada, y tamaño y edad de las crías

Cajas o jaulas

El tamaño de las jaulas elegidas debe ser apropiado para cada especie alojada. Las jaulas no deben permitir solamente guardar los animales de una manera segura, sino también garantizar su comodidad, permitiendo ajustes de postura y de comportamiento normales, y contribuir al enriquecimiento ambiental. Los animales sociales por naturaleza no se deben alojar solos, a menos que eso sea un requerimiento del protocolo de investigación, y que sea aprobado por el Comité de cuidado y uso de los animales. Las jaulas deben ser adecuadamente ventiladas, permitir un campo visual satisfactorio para los operadores y un acceso fácil a los animales. Los sistemas de bebederos y de distribución de alimentos deben ser planificados y ubicados para permitir su acceso fácil, sin que se contaminen con excrementos. El diseño de las jaulas debe facilitar su limpieza y desinfección. Lamentablemente, este último factor suele ser el único tenido en cuenta, lo que unido a la conceptualización del animal como reactivo acaba generando situaciones totalmente reñidas con el bienestar animal.

La intensidad luminosa percibida por los animales, el nivel de ruido al que están expuestos, la ventilación y la temperatura de su microambiente, están afectados por el material y el diseño de las jaulas. Se debe tener mucho cuidado cuando se elige una jaula para una especie y un uso específicos. El alojamiento de animales en jaulas diseñadas para otras que las especies convencionales de laboratorio, requiere una consideración especial.

A menos que sea contraindicado por la naturaleza de la investigación (p. ej., estudios sobre nutrición), las cajas de piso entero serán las que se empleen (en vez

de jaulas con fondo alambrado) para los roedores, porque permiten la creación de microambientes y facilitan el enriquecimiento ambiental.

Las cajas rectangulares (tipo caja de zapatos), se utilizan principalmente para roedores pequeños, y convienen particularmente para la reproducción. Están generalmente hechas de plástico, tal como el policarbonato, el polipropileno y la polisulfona entre los más utilizados. El policarbonato es transparente, resiste al autoclavado y a la mayoría de los desinfectantes. El polipropileno no resiste bien a temperaturas elevadas (> de 100°C) por lo que la esterilización por autoclavado no es posible. Las jaulas de polipropileno son translúcidas y permiten más intimidad para los animales, lo que puede ser beneficioso para algunas razas o especies silvestres. Sin embargo, no se debe colocar las jaulas opacas sobre estantes arriba del nivel de los ojos, dado que no se pueden observar fácilmente los animales. La polisulfona es un termoplástico semitransparente color ámbar, de alto desempeño y resistencia térmica. Ofrece excelentes propiedades de resistencia mecánica, eléctrica y en relación al policarbonato, una mejorada resistencia química.

En estas cajas se usa lecho de contacto (p. ej., viruta de madera, mazorca de maíz molido, etc.) lo que permite al animal modelar su propio microambiente. Estas cajas son confortables e ideales para la reproducción. Sin embargo, los animales en las cajas de diseño estándar están en contacto con sus excrementos y la circulación de aire está reducida. Por lo tanto, es importante limpiarlas frecuentemente. Si se emplean en estas cajas tapas filtros, esto reduce aún más la circulación de aire si las jaulas no están ventiladas individualmente. La acumulación rápida de amoníaco, de gas carbónico y de humedad requiere una limpieza más frecuente (hasta tres veces

por semana pueden ser necesarias). Las cajas de diseño moderno para emplearse en racks ventilados resuelven el problema de la ventilación interna lo que permite remover los contaminantes gaseosos del interior de las mismas, contribuyendo con el bienestar de los animales al brindarle un medio ambiente más óptimo (Poole T. 2010).

Las cajas rectangulares se pueden equipar con un fondo de alambre para ciertos proyectos que requieren que no haya contactos con las excretas.

Jaulas suspendidas

Las jaulas suspendidas pueden ser provistas con puertas en la parte superior o delantera. La mayoría de las jaulas con apertura en la parte superior utilizan el estante como techo de la jaula. Se usan principalmente para roedores pequeños, mientras que las jaulas con apertura en la parte delantera convienen más para cobayos, gatos, perros, conejos y primates no humanos (PNH).

La mayoría de las jaulas suspendidas tienen un piso alambrado, de barras de acero, de metal o de plástico perforado, arriba de una bandeja de recolección o de un piso entero. Es sumamente importante que el tamaño de las perforaciones del piso sea apropiado para las especies alojadas. Estas perforaciones deben ser suficientemente grandes para permitir que las excretas las atraviesen fácilmente, pero suficientemente pequeñas para impedir heridas de pata o de pie. El tamaño de las mallas debe soportar el peso de los animales sin curvarse. Los pisos deben ser diseñados de tal manera que los pies se puedan afirmar cuando los animales se

mueven, y para prevenir el resbalamiento. Los pisos de alambre no son apropiados para los cobayos o para las jaulas de maternidad de los roedores.

En jaulas suspendidas, los animales no están en contacto con sus excretas y están generalmente bien ventiladas. Las bandejas de recolección de las excretas se pueden limpiar más frecuentemente y molestan menos a los animales.

Los animales, sin embargo, no tienen la oportunidad de crear su propio microambiente, de manera que el control del ambiente de la sala llega a ser más importante. Se recomienda que estas jaulas estén hechas de acero inoxidable u otra aleación de metal tejido, de plástico resistente a la corrosión y/o, en el caso de algunas jaulas con abertura delantera, de fibra de vidrio. La fibra de vidrio es fuerte, y más resistente al ruido que otros materiales, de manera que conviene especialmente para las jaulas de cuidado postoperatorio (CCAC, 1995).

Otras jaulas

Muchas jaulas están diseñadas para ser usadas según requerimientos específicos. Por ejemplo las jaulas de metabolismo, las que tienen dispositivos de ejercicios mecánicos, las comunitarias, las de traslado, las de inmovilización, y las jaulas que permiten entrar al personal y son utilizadas para alojar grupos de animales.

Todos los tipos de jaula deben ser construidos con el propósito de asegurar el bienestar de los animales durante su confinamiento.

Alimento y agua

Habitualmente a los roedores se les administra comida en forma de pellets y bebida *ad libitum*. En general, se les suministra el mismo tipo de dieta a todos los ratones y ratas con independencia de la edad, gestación o lactancia. Estos lo ingieren de forma semicontinua, principalmente durante el periodo de oscuridad. Los animales libres de patógenos (SPF) y axénicos no tienen una flora normal, y pueden carecer de las bacterias necesarias para la síntesis de algunas vitaminas (vitaminas K y del complejo B), siendo necesario sumarlo a la dieta. Dependiendo del contenido energético de la dieta, cada ratón consume aproximadamente unos 3-4 g al día. El comedero debe estar bien lleno porque a los animales les resulta difícil roer la comida cuando quedan sólo unos cuantos granos de alimento. La digestión microbiana y el posterior consumo de heces (coprofagia) proporcionan al animal ciertos nutrientes de forma indirecta.

El agua puede suministrarse mediante biberones o por un sistema de bebida automática, y debe ser potable y estar libre de patógenos o contaminantes. Para conseguirlo, el agua puede clorarse o acidificarse, filtrarse o irradiarse con luz ultravioleta. La acidificación del agua hasta un pH de 2.5 es una práctica ampliamente extendida para el control de la microflora, particularmente en los sistemas de bebida automática. Sin embargo, no debe realizarse cuando se agregan al agua antibióticos o vitaminas. La falta de agua se tolera peor que la falta de alimento, variando la gravedad según la especie y el estado fisiológico del animal. En general, los síntomas aparecen a los 2-3 días y la muerte, poco tiempo después, si no se remedia la situación.

Las necesidades de agua dependerán en gran medida del contenido en agua de la dieta y de las circunstancias ambientales.

1.6 CONDUCTA, ESTRÉS Y BIENESTAR

¿Qué es el bienestar animal?

Antes de comenzar a definir qué es el bienestar animal deberíamos preguntarnos: ¿Por qué preocuparse por el bienestar?; y esta sería tal vez la primera pregunta que tendríamos que hacernos cuando se empieza a considerar el bienestar animal. Si no tenemos ninguna obligación moral o ética hacia los animales conducentes a su bienestar, no hay razón entonces para considerar si este es bueno o malo. Por otro lado, si tenemos obligaciones morales, entonces debemos ser capaces de evaluar el bienestar animal cuando trabajamos con ellos.

El bienestar animal tiene dos componentes: físico y comportamental. El bienestar físico se manifiesta por un estado excelente de salud. El bienestar del comportamiento se manifiesta por el desarrollo comportamental completo específico de especie/cepa dada, junto con la ausencia de comportamientos atípicos para la especie. El bienestar del comportamiento refleja el bienestar psicológico, de manera que estos dos términos llegan a ser sinónimos para nuestro uso.

Para crear un estado de bienestar, cada animal necesita un ambiente social en el cual puede gozar de un mínimo de contactos básicos y de relaciones sociales positivas. El comportamiento social permite a los animales adaptarse a las condiciones de alojamiento. Enjaular a los animales, solos, por pareja o por grupos,

debería ser hecho de manera de crear un ambiente estimulante apropiado para cada especie.

También debe mencionarse que el término **bienestar** se confunde o aplica como sinónimo de **estar bien** y viceversa, lo cual no es correcto.

“Estar bien” debería relacionarse con la calidad de vida del animal en el corto plazo (De Grazia 1996), mientras que “bienestar” es lo indicado a largo plazo.

Por ejemplo en orden de mejorar su bienestar, puede ser necesario reducir temporalmente su estar bien durante una vacunación. El bienestar aumentará debido a la reducción del riesgo de exponerse a una enfermedad seria resultando así en una vida larga y de mejor calidad.

El estar bien del animal al igual que el bienestar puede ser alto o bajo y debe ser siempre evaluado por el responsable del cuidado de los animales. La Organización Mundial de la Salud (WHO) define salud como el estar bien mental y físicamente y no solamente como ausencia de enfermedad, aunque la mayoría de los científicos se refieren a salud animal como una condición inferior de bienestar y no de otra manera. Los animales pueden estar perfectamente saludables pero aun así tener una pobre calidad de vida si están alojados en una pequeña caja. Pero pasemos a definir bienestar animal.

Definiendo bienestar

1. Broom (1986) describe el bienestar animal como "el estado en el cual se encuentra un animal que trata de adaptarse a su ambiente".

2. Blood y Studdert (1988) lo definen como "el mantenimiento de normas apropiadas de alojamiento, alimentación y cuidado general, más la prevención y el tratamiento de enfermedades".
3. La American Veterinary Medical Association (AVMA) amplía este concepto para incluir "todos los aspectos de bienestar animal, incluyendo el alojamiento apropiado, el manejo, la alimentación, el tratamiento y la prevención de enfermedades, el cuidado responsable, la manipulación humanitaria y, cuando fuese necesaria, la eutanasia humanitaria" (Anon, 1990).
4. Fraser (1989) nota que el bienestar animal comprende "...ambos el físico y el psicológico. Estos normalmente coexisten. El bienestar físico se manifiesta por un buen estado de salud. El bienestar psicológico se refleja, por su parte, en el bienestar del comportamiento. Este último es evidente en la presencia de comportamiento normal y la ausencia de comportamiento considerablemente anormal."
5. La Asociación Mundial Veterinaria (AMV) afirma que la etología animal "pone el énfasis en el conocimiento científico. Su objetivo es de clarificar: a) las necesidades a satisfacer; y b) los daños que se pueden evitar..." (AMA, 1989).
6. Hurnik (1988) define el bienestar animal como "un estado o condición de armonía física y psicológica entre el organismo y su medio." Sin embargo, el bienestar animal no es un fenómeno único, y no existe una definición que satisfaga a todos (Moberg, 1992; Baxter, 1993; Duncan y Dawkins, 1983).

7. La Real Sociedad para la Prevención de la Crueldad a los Animales reconoció recientemente la necesidad de llamar la atención sobre el estrés en los animales de experimentación y aliviarlo cuando se asocia con el sufrimiento (RSPCA, 1992). Una bibliografía anotada sobre el bienestar animal ha sido preparada recientemente (Murphy, Rowan y Smeby, 1991).

8. También, hay que acordarse siempre de la definición sensible escrita hace más de tres décadas por Hollands: "Esto entonces es mi definición del bienestar animal: acordar a los animales la dignidad natural que merecen como seres vivos y sensibles" (Hollands, 1980).

Tomando la definición de Broom, por ejemplo, se desprende que el bienestar de un animal es seriamente afectado por la falla de adaptarse y de la propia adaptación, es decir, cuanto ha hecho ese individuo para adaptarse y que tan bien o que tan mal le ha ido en ese proceso. Entre sus considerandos se destaca que:

- El bienestar es una característica de un animal y no algo que se le otorga.
- Este bienestar puede variar desde muy pobre a muy bueno.
- El bienestar debería poder medirse de una manera científica independientemente de las consideraciones éticas.
- Las medidas de cuán difícil le ha resultado a un individuo lograr adaptarse nos da una idea de cuan pobre es su bienestar.

- El conocimiento de las preferencias de un animal nos da una información invaluable para lograr que tenga un buen bienestar, pero las mediciones directas de cómo se encuentra ese animal se deben utilizar para mejorar el mismo.

- Los animales emplean una gran variedad de repertorios para lograr adaptarse al medio, pero también existe una gran variedad de consecuencias cuando fallan en ese proceso de adaptación por lo que cualquier medición de esas fallas nos va a indicar que el bienestar es pobre y el hecho de que una medida, como el crecimiento, sea normal no significa que el bienestar sea bueno.

Por otra parte si consideramos los criterios de Fraser (2004) históricamente existen tres eventos destacados que han tenido influencia en los estándares del bienestar animal y el estudio científico del mismo.

- El primero es la revolución de los animales para la ganadería que tuvo lugar en los años 50 en los países desarrollados, que incluía el uso de sistemas de producción intensiva de ganado bovino y porcino donde los animales no tenían exposición al exterior y sufrían restricción de movimientos. Estos cambios en el alojamiento han provocado modificaciones en la selección genética, la producción, la formulación del alimento y el uso de fármacos para mejor rendimiento. Sumado a esto la revolución incluyó movimientos desde la pequeña producción hacia la producción especializada a gran escala.

- Estos cambios movilizaron el interés de organizaciones defensoras de los animales hacia las condiciones de vida de los mismos y el impacto en el medio ambiente que provocan las unidades de producción de gran envergadura.

- El segundo es el rápido cambio de opinión desde los años 50 a una actitud más humanitaria hacia los animales especialmente en Europa. Estos cambios de actitud han conducido a elevar los estándares del cuidado animal en todos los campos incluido el de la investigación, entretenimiento y manejo de las poblaciones silvestres.

- El tercero es el escepticismo creciente mostrado por los consumidores hacia la tecnología, la industrialización y el poder de las corporaciones, especialmente cuando eso se introduce en la vida de las personas y los procesos naturales. Esto se traduce en protestas contra la globalización y el comercio de alimentos genéticamente modificados entre otros. Estos cambios en la percepción del público han resultado en más críticas y juzgamientos éticos en la producción de alimentos y de los estándares impuestos por la industria.

En el año 1965, la Comisión Brambell emitió un informe donde se describieron las "Cinco Libertades" de los animales domésticos: como la capacidad de poder fácilmente "darse vuelta, asearse, levantarse, acostarse y estirarse" (Brambell, 1965). En 1989, la World Veterinary Association adoptó sus propias cinco libertades, que se aplican a todas las especies y que son basadas en las del Britain's Farm Animal Welfare Council (FAWC) (Webster, 1965). El FAWC ha enmendado recientemente estas cinco libertades, que definen los estados ideales para los animales y que ahora incluyen:

- 1) Libres de hambre, sed y malnutrición.
- 2) Libres de incomodidad física y dolor.
- 3) Libres de sufrimiento, heridas y enfermedades.

4) Libres de miedo y angustia prolongado.

5) Libres para expresar un comportamiento normal esencial.

Este marco general es aplicable a todos los animales mantenidos en cautiverio.

Las primeras cuatro libertades se refieren a experiencias aversivas. De todos modos, es posible que un animal esté enfermo sin que él lo perciba y aun la enfermedad podría afectar el funcionamiento natural del animal como puede ser la reproducción. Por ejemplo si una rata preñada se infecta con el virus Kilham la infección no afectará a la rata preñada, pero si atraviesa la barrera placentaria, esto puede resultar en abortos o malformaciones en los fetos.

Asimismo, se debe tener en cuenta que si un animal esta atormentado lo más probable es que no pueda sobreponerse de una situación difícil. Con buen alojamiento y buenas prácticas de manejo se minimizan las condiciones que llevan al miedo y angustia entre los individuos. En ambos casos el funcionamiento natural del animal está comprometido.

En la última de las libertades se observa que no se define claramente el término “comportamiento normal esencial”. Sin embargo, lo que es indudable, es que los ambientes estériles en los bioterios contribuyen a expresiones de “comportamientos anormales” en la mayoría de las especies; por el contrario, los ambientes que simulan condiciones naturales y/o que promueven la expresión de comportamientos típicos de la especie siempre serán beneficiosos (Hau & Shapiro, 2007).

Se considera que las normas establecidas desde hace 50 años cumplen con los requerimientos de alojamiento óptimo para los animales de experimentación.

Muchos de los mejoramientos en las condiciones de alojamiento y las normas de manejo fueron creados, primariamente, para reducir las variables y mejorar la reproducibilidad de los resultados experimentales (Vessell & Lang, 1976). Durante la última década, los esfuerzos fueron dirigidos hacia las necesidades de comportamiento y sociales de los animales mantenidos en el laboratorio. La mayoría de las investigaciones sobre el mejoramiento del ambiente del animal se concentraron sobre los "mamíferos superiores", particularmente los PNH.

Frecuentemente, se cree que los conejos y roedores de laboratorio tienen relativamente pocos requerimientos, con excepción de las necesidades esenciales de alojamiento, de manejo, y de nutrición. Así, se hizo énfasis sobre el control del ambiente, dejando de lado las otras áreas.

A menudo, es difícil evaluar objetivamente el "bienestar" en estas especies. Algunos ejemplos de criterios que se han usado en estudios de este tipo son la ganancia de peso, el comportamiento general y el peso de las glándulas suprarrenales (Chamove, 1989).

Ahora bien, habiendo definido bienestar y su problemática, queda claro que si tenemos la obligación moral de asegurar el bienestar a los animales, necesitamos evaluarlo de alguna manera. Según Sorensen (2007) la mejor manera de hacerlo es siguiendo siempre el método científico. La interpretación de estas mediciones va a depender de dos tipos de enfoques; uno científico y otro filosófico.

Según el enfoque científico, si los valores básicos obtenidos son objetivos como lo es el buen funcionamiento biológico o la posibilidad de que los animales realicen comportamientos naturales, esto puede ser medido a través de parámetros

reproductivos, prevalencia de enfermedades, niveles de cortisol y de comportamientos estereotipados.

Según el enfoque filosófico, si los valores básicos obtenidos son de naturaleza subjetiva, relacionados con el estado natural interno del animal, tales como sentimientos y preferencias; estas mediciones son de por sí indirectas y sólo será posible evaluarlas a través de ciertos comportamientos del animal lo que nos dará una medida indirecta de dichos sentimientos y preferencias. Sin embargo, recientemente se han desarrollado métodos basados en las expresiones faciales y en el desvío cognitivo relacionado con los sentimientos que permiten inferir algunos estados internos (Langford D. y col, 2010).

La evaluación del estado de bienestar en los animales generalmente se realiza de manera indirecta a través de lo que se llaman indicadores de bienestar empleando para ello el monitoreo de comportamientos apropiados y parámetros fisiológicos. Lo óptimo es definir a que llamamos *un buen bienestar* como punto de referencia para la especie o cepa en cuestión. Ese nivel hipotético de bienestar ideal podría definirse como el estado de los animales cuando se alcanzan las necesidades nutricionales, de salud, medioambientales, comportamentales y mentales (Mellor D, 1994).

Los tres componentes principales de un estado ideal de bienestar se sustentan en el **estado físico**, **estado psicológico**, y el **estado fisiológico/bioquímico**.

El **estado físico** se caracteriza por un buen nivel de aptitud física, sin incapacidades que puedan producir incomodidad o miedo o que pueda tener un

impacto en la condición física que pueda producir angustia. Indicadores observables de la condición física de un animal son:

- La postura del cuerpo
- El pelaje del animal
- El peso del cuerpo
- Cojeras

El **estado psicológico** se caracteriza porque el animal despliega un apropiado rango de comportamientos de acuerdo a lo que es conocido para esa cepa o especie. Los indicadores de este estado serían:

- Aumento de la agresión hacia sus compañeros de habitáculo
- Huidas o retiradas
- Estereotipia
- Cambios en el uso del enriquecimiento

El **estado fisiológico** se caracteriza porque los niveles de estrés y angustia no sobrepasan esos que podrían ocurrir en el curso de interacciones sociales normales, por ejemplo si se debe medir la tasa de latido cardiaco o presión sanguínea no se esperaría que indicaran estrés significativo. Los indicadores serían parámetros fisiológicos como frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria, niveles de hormonas como los corticosteroides.

Una buena elección de estos indicadores de bienestar debería incluir una combinación de los tres tipos mencionados, para permitir una buena evaluación de interpretación del estado de un animal (Hawkins P. y col.2011).

Siempre hay que considerar que se deben evaluar cuidadosamente las condiciones de alojamiento para cada especie ya que el conocimiento de los modelos de comportamiento normal en cada especie es esencial. Por ejemplo, la coprofagia (reingestión de excrementos) es una actividad normal en varias especies, incluyendo los conejos y las ratas. Las ratas ingieren normalmente entre 35-65% de sus excrementos diariamente. En ratas privadas de esta oportunidad, se observaron entre 15-25% de reducción en las ganancias de peso (Newton, 1978).

El Bienestar animal en términos de preferencias y sentimientos:

Muchos científicos concuerdan en que los sentimientos son muy importantes en el bienestar animal.

Dawkins (1990) dice que el bienestar animal involucra los sentimientos subjetivos de los animales y Duncan (1998) sostiene que son los sentimientos los que gobiernan el bienestar animal y son estos sentimientos los que deberían medirse en orden de asegurar el bienestar animal.

Sentience, traducido al español como sentiencia, sensación, sentimiento más allá de la percepción mental, animales sentientes es un vocablo relativamente nuevo que debemos incorporar si queremos entender el bienestar animal. (Chandrasekera 2016).

Los sentimientos en animales se refieren a la capacidad de sentir y experimentar emociones tales como alegría, placer, dolor y miedo. La capacidad de los animales de sentir estados positivos y negativos son los que impulsan el movimiento hacia el

bienestar y justifican por que las leyes de protección animal existen (Proctor H. 2015).

Los sentimientos en animales son difíciles de medir, pero si se asume que un animal prefiere situaciones placenteras y evitar las negativas o desagradables, se pueden estimar los sentimientos midiendo las preferencias del animal (Sorensen 2007).

Los sentimientos y estados de ánimo se entienden como una adaptación, orientada a evitar castigos y obtener recompensas. Una de las formas en que las emociones contribuyen al bienestar, y de hecho, a la organización del comportamiento, es actuando como una “moneda corriente”, que permite priorizar acciones. Las conductas que no pueden compararse por sus mecanismos o resultados (comer, refugiarse, buscar conspecíficos), sí pueden serlo por las emociones o estados de ánimo asociados a ellas: entonces, un comportamiento relacionado con lo social y otro relacionado con lo alimentario, pueden compararse en base al estado de ánimo que producen, como quien compara los precios de cosas diferentes (Mendl y col. 2008); por eso el término “moneda corriente”.

Las preferencias pueden medirse usando un test de elección pero estos ensayos deben utilizarse con cuidado, ya que solo aportan una idea de una elección o preferencia en un instante dado por parte del animal. Es el trabajo del investigador balancear entre el deseo presente del animal y el conocimiento científico lo que nos dirá acerca de qué factores ambientales pueden beneficiar al animal a largo plazo.

Queda claro que la adaptación de un animal sólo puede darse dentro de los límites genotípicos y fenotípicos del individuo. Cuanto más amplia sea la escala reguladora de los mecanismos homeostáticos en términos tanto de conducta como de fisiología, mejor se garantizará el bienestar de los animales. Las condiciones extremas tales como las bajas temperaturas ambientales no afectarán al bienestar del animal siempre que las condiciones sean controlables por medio del repertorio completo de mecanismos como construcción de nidos, metabolismo, tiritar, etc. Por lo tanto, un juicio sobre hasta qué punto el bienestar puede verse afectado por la adaptación a ciertas condiciones tiene que basarse en un conocimiento exhaustivo de la especie animal utilizada. Dependiendo de la especie animal y de su organización social normal, los factores ambientales tales como el tamaño y estructura de la jaula, luz (intensidad, longitud de onda, fotoperiodo, frecuencia de parpadeo), sonidos, ventilación, etc., son tan importantes como la presencia o ausencia de sus congéneres, su sexo y la predictibilidad y controlabilidad del medio ambiente. Existe un cierto peligro de antropomorfismo en el juicio de la importancia relativa de estos factores, puesto que las condiciones adecuadas para conseguir el bienestar humano no tienen por qué serlo también para los animales. Esto es aplicable a la comparación entre las diferentes especies animales y entre las cepas de una misma especie.

Este problema se puede solucionar midiendo la preferencia de un animal por ciertas condiciones ambientales, utilizando para ello un test de preferencia. Otra manera de abordar este tema es a través de un sistema de puntuación para los signos de estrés o sufrimiento, basado en parámetros comportamentales y clínicos.

Existen diversas listas de indicadores tales como la pilo erección, o una reducción de peso corporal, una frecuencia cardíaca incrementada, diarrea, etc. Cada uno de estos sistemas tiene como objetivo estimar el nivel de sufrimiento basándose en parámetros clínicos, fisiológicos y conductuales. Aunque la mayoría de estos parámetros se pueden determinar de forma objetiva, la cuestión de hasta qué punto son indicadores del bienestar dependerá de la interpretación de los mismos.

Hablar de bienestar animal implica conocer los mecanismos básicos conductuales y fisiológicos que permiten que, en este caso los mamíferos, se adapten a los desafíos ambientales. Entre esos mecanismos se encuentra la “homeostasis”, cuyo concepto implica que los aspectos del medio interno (como la temperatura corporal, la glucosa en sangre, el contenido de agua del cuerpo, etc.) y del medio ambiente (tales como la posición que se ocupa en un grupo social, etc.) se mantienen a un nivel constante o al menos predecible durante cierto tiempo. Un animal sólo puede mantener la homeostasis cuando es capaz de comparar su situación actual con una situación uniforme o estándar en lo que se refiere a ciertos factores internos o externos y cuando cuenta con los medios conductuales y fisiológicos para normalizar la situación (Bohus B. y col. 1987).

Los factores ambientales pueden alterar el equilibrio biológico. Siempre que el animal es capaz de adaptarse a estos cambios sin problema se dice que se encuentra en situación de homeostasis o en armonía. Sin embargo, cuando un animal es incapaz de mantener la homeostasis, después de cierto tiempo se genera una respuesta caracterizada como síndrome general de adaptación o estrés (Moberg G.B., 1987), donde el sistema desvía recursos de otras funciones, para retornar al

conjunto de valores que aseguran la supervivencia. Cuando lo logra, describimos el proceso como la aparición de un estrés agudo. Si no lo logra, continúa tratando de restablecerse en los valores perdidos, desviando cada vez más recursos, hasta que finalmente, se daña de manera irreversible. A eso lo llamamos estrés crónico, o diestrés.

En el estudio de la capacidad de los animales para adaptarse a los desafíos ambientales de la vida diaria en un hábitat natural, intervienen dos mecanismos bastante característicos. En primer lugar, en el curso de la evolución, los animales han sido seleccionados entre una población de organismos genéticamente diferentes por su mejor adaptación a las demandas ambientales desde un punto de vista morfológico, fisiológico y conductual. Este tipo de selección forma la base de la especiación (filogenia). El segundo mecanismo es la selección basada en el individuo mismo, es decir, la selección de entre una variedad de soluciones conductuales potenciales a las demandas del medioambiente. Este mecanismo (aprendizaje) es de especial importancia durante el desarrollo del individuo (ontogenia) pero también en el adulto. Estos dos mecanismos de selección producen en los animales una conducta adaptada al medio ambiente.

Respecto de la filogenia, muchos estudios han mostrado que el comportamiento tiene una base genética firme debido al hecho de que en el curso de la evolución, han sido eliminados los individuos genéticamente peor adaptados a las condiciones ambientales concurrentes. Esta forma de selección es la base del comportamiento específico de la especie, así como de la morfología y de la fisiología de los animales, incluyendo la de los animales experimentales actuales. En su hábitat original y

natural, los animales se caracterizan según el condicionamiento de su morfología, conducta y fisiología. Por lo tanto, la escala reguladora de los mecanismos homeostáticos es más amplia o restringida en función a las variaciones ambientales a las que el animal se enfrenta en su vida diaria. Entonces, si los mecanismos homeostáticos no son los adecuados, los cambios del medio ambiente harán necesario que estos mecanismos adquieran características completamente diferentes. Por ejemplo cuando un animal salvaje se introduce en una jaula que es distinta de su hábitat natural, puede mostrar una conducta mal adaptativa a las nuevas condiciones de forma repetida, lo que pondrá de manifiesto los sentimientos de restricción derivados de una obstrucción de la capacidad adaptativa heredada (Stamp-Dawkins M, 1980).

Durante el proceso de domesticación, los animales de experimentación han adquirido nuevas características específicas. Si tenemos en cuenta la hipótesis de la auto domesticación propuesta por Morey 1994, observamos cómo se correlacionan cambios en rasgos no sólo comportamentales sino que incluyen además cambios en la morfología, fisiología, cognición, coloración del cuerpo, forma craneal, tamaño del cerebro, activación del eje hipotalámico, pituitario, adrenal y capacidad para resolución de problemas. En experimentación reproductiva con una amplia variedad de mamíferos el “síndrome de la domesticación” es enteramente un producto de la selección contra la agresión (Trut y col. 2009). Esto queda evidenciado, por ejemplo, en la evolución del perro desde los lobos; en dichas etapas y sin la intervención del hombre, los lobos menos agresivos ganaron una ventaja selectiva porque pudieron aproximarse más a los asentamientos de humanos y explotar mejor una nueva

oportunidad ecológica (Peterson y col. 2004), para que posteriormente esos perros mostraran una tendencia a comportarse más pro – sociables. Posteriormente, fue en una segunda etapa que la reproducción intencional de perros pudo comenzar (Zeuner 1963, Morey 1994, Coppinger 2001, Hare & Tomasello 2005, Wobber y col. 2009).

Sin embargo, esto no significa que el comportamiento propio de la especie haya desaparecido. En términos generales sólo se modificarán aspectos de poca importancia. La conducta esencial para sobrevivir (es decir, alimentarse, construcción de nidos y conductas sociales como la ofensiva, defensiva, sexual, paternal y maternal) está determinada en gran medida por la genética y estará presente en las crías incluso aunque la selección no esté a su favor. Este conjunto de pautas de comportamiento propias de la especie no se puede modificar a través de la experiencia, o al menos no sin gran dificultad, y se mostrarán incluso aunque el medio ambiente impida que se expresen en su totalidad.

La selección realizada por el medio ambiente es un factor importante en la filogenia de la conducta adaptativa. Sin embargo, los animales no dependen en su totalidad de la conducta genéticamente programada. Dentro de sus límites genéticos, los animales individuales pueden modificar su repertorio conductual por medio del aprendizaje tanto durante la ontogenia como en la etapa adulta.

Esto quiere decir que el encierro en una jaula no va a lograr modificar comportamientos innatos que se han desarrollado a lo largo de la evolución de la especie y que aunque ahora la selección (del tipo que sea natural, artificial o

experimental) actúe en contra de sus necesidades comportamentales el individuo de una u otra manera intentará encontrar la manera de arreglárselas.

Existen diversas definiciones de aprendizaje:

- Proceso por el cual se cambia una conducta como resultado de una práctica que produce una alteración relativamente permanente (Mednick, 1958).
- Conjunto de pautas por las cuales el animal se adapta a una situación nueva para la cual no tiene respuesta hereditaria inmediata (Thorpe 1963).
- No existe una definición universalmente aceptada de aprendizaje. Los autores emplearán, en su análisis, la que afirma que se trata de cambios específicos o modificaciones de comportamiento involucrando el sistema nervioso como resultado de la experiencia con eventos o series de eventos externos, en la vida de un individuo.

Concentrándonos en los eventos externos, podemos excluir fatiga y maduración. Especificando que se involucra el sistema nervioso, excluimos otros cambios, como ruptura de huesos (Grier & Burk.1992).

Independientemente de que definición se tome, en el aprendizaje, el fenotipo de un individuo es el resultado de una compleja interacción entre el genotipo y una situación ambiental concreta. Un importante aspecto del fenotipo, y que por lo tanto se ha estudiado con detenimiento, es la capacidad de aprender basado en el genotipo y las experiencias propias.

Existen varios tipos de aprendizaje que los animales emplean y podemos resumir:

Aprendizaje pre asociativo: habituación y sensibilización

Aprendizaje asociativo: condicionamiento clásico o pavloviano, aversión gustativa, condicionamiento operante o instrumental,

Aprendizaje latente o exploratorio

Aprendizaje espacial o de lugares

Aprendizaje cultural u observacional

Aprendizaje social dirigido

Aprendizaje por comprensión

Aprendizaje por formación de conjuntos

Aprendizaje instintivo o preprogramado

Troquelado

El aprendizaje es un mecanismo que permite la adaptación de la conducta a los cambios temporales del medio ambiente de forma flexible y rápida. Sin embargo, existen restricciones específicas de la especie con relación a las capacidades para aprender. Una de estas restricciones está relacionada con los estímulos que el animal puede percibir. Los estudios sobre conducta demuestran que ciertos estímulos provocan una conducta determinada en la especie incluso sin la existencia de una experiencia previa.

Los demás estímulos se pueden asociar con la conducta a través de procesos de aprendizaje, y como tales, pueden adquirir cierta significación o modificar dicha significación (condicionamiento pavloviano del estímulo). La primera respuesta de un animal ante un estímulo desconocido es una respuesta de alerta y (en muchos casos) de orientación. Si el estímulo no tiene consecuencias (ya sean positivas o

negativas) para el individuo, después de repetidas presentaciones ya no responderá. Este proceso de habituación evita así que el organismo reaccione ante estímulos irrelevantes (habituación). Sin embargo, si el estímulo está asociado a consecuencias positivas o negativas se produce un aprendizaje (condicionamiento a estímulo), aunque tanto la habituación como el condicionamiento pueden desaparecer. Cuando un estímulo al que el animal se ha habituado desaparece durante un período de tiempo, emergerá de nuevo la respuesta de orientación original. De manera similar, cuando un estímulo condicionado se presenta con frecuencia en ausencia del estímulo no condicionado asociado, la reacción ante este estímulo desaparecerá. El organismo habrá aprendido que el estímulo ya no tiene significación, sin embargo, no se habituará del todo a los estímulos signo ni éstos desaparecerán por completo y si alguna de estas cosas ocurre, sólo será durante un período de tiempo muy corto.

Un organismo también puede aprender que cierta conducta puede tener consecuencias agradables o desagradables. Este condicionamiento de la conducta (condicionamiento operativo) puede producir un incremento o disminución de la frecuencia de actuación cuando se consideran ciertas conductas en determinadas condiciones ambientales. Por ejemplo: las ratas suelen preferir la oscuridad. Cuando se colocan en el lado iluminado de una caja con dos compartimentos pasarán al lado oscuro con rapidez. Sin embargo, si esta respuesta es seguida por un castigo (débil descarga eléctrica), la próxima vez que sea colocada en el lado de la luz, la rata se quedará allí, es decir habrá aprendido a evitar la situación “desagradable”(Calhoun J.B., 1962).

Los mismos mecanismos involucrados en el condicionamiento por estímulo también se encuentran en el condicionamiento de la conducta. Se puede pensar que estos procesos de aprendizaje son mecanismos que se derivan de la capacidad de los animales para distinguir las relaciones causales en su medio ambiente, es decir para distinguir la información de los “ruidos”.

Existen grandes diferencias entre las especies en lo que se refiere a los procesos de aprendizaje, no solo en cuanto al nivel de importancia del mismo en la adaptación conductual, sino también en cuanto a los tipos de conducta que se pueden modificar a través de la adquisición de la instrucción.

Es imposible asociar cualquier estímulo a cualquier suceso posterior de la misma forma que no todos los tipos de conducta pueden ser utilizados para obtener el efecto deseado. Por ejemplo en ratas, es casi imposible asociar los estímulos de luz o sonido a una enfermedad posterior inducida por agua envenenada, pero se puede establecer con mucha facilidad una asociación entre el sabor del agua y la enfermedad (aversión gustativa). Es casi imposible enseñarles a hámsteres a obtener comida por medio de una conducta de acicalamiento, mientras que es fácil hacerlo utilizando otras pautas tales como escarbar o explorar. Cuando ciertos sistemas de alojamiento requieren un proceso de aprendizaje, por ejemplo para obtener comida o agua, hay que tener en cuenta que la combinación particular entre el estímulo y el objeto que lo provoca ha de permitir que el animal la aprenda con facilidad.

El conocimiento del medio ambiente en combinación con los medios conductuales y fisiológicos disponibles permite al animal mantener la homeostasis. Aunque este

conocimiento esté basado en procesos de aprendizaje existen restricciones considerables. Las especies tienen programas específicos para obtener comida y agua, pero también en lo relativo a la reproducción, relaciones sociales, etc. Muchos de estos programas llevan consigo un cierto nivel de rigidez y no se pueden modificar a través del aprendizaje, es decir, ciertos componentes no se pueden omitir sin consecuencias para el animal. Por ejemplo, en los mamíferos jóvenes, el alimento tiene que obtenerse mamando; de forma similar, los cerdos para conseguir el alimento hocican, los pollos escarban el suelo y los roedores roen.

Cuando estas conductas se convierten en redundantes debido al suministro de comida preparada, y el animal no puede ejecutar esas conductas, estas pueden ser redirigidas hacia otros objetos o individuos. Por lo tanto, un buen sistema de alojamiento debería ajustarse a los programas específicos de la especie animal.

Esto hace referencia a la noción de *necesidad comportamental*. Cuando se consideran las necesidades comportamentales de una especie se debe tener en cuenta cuán importante es para la especie que desarrolle ese comportamiento y qué fuertemente motivado ese comportamiento está y no qué función tiene. “En términos evolutivos la causalidad de un comportamiento se encuentra divorciado de su función” (Duncan 1998). Un ejemplo que es familiar a la mayoría, es el comportamiento del perro, el cual gira 2 – 3 veces antes de echarse a dormir. Esto se debe a que en la naturaleza ese comportamiento tenía la función de aplastar el pasto para armar su cama. Este comportamiento ha sido retenido en los perros domésticos aunque ahora no tenga ninguna funcionalidad. Parecería que este comportamiento de girar ha sido pre programado en su rutina de dormir y es

causado por factores internos del animal, y aunque actualmente no tenga función, es importante para su bienestar.

La ontogenia realiza una importante contribución en lo que respecta a las capacidades de adaptación del organismo durante la etapa adulta, dentro de sus límites genéticos. Tanto los factores prenatales como postnatales ejercen una influencia considerable sobre las características conductuales y fisiológicas del adulto. En los mamíferos, el ambiente interno de la madre afecta al desarrollo desde el momento de la concepción. Por ejemplo, las crías de madres que experimentan estrés durante la gestación o lactancia mostrarán una conducta social diferente en la etapa adulta. En el desarrollo de la conducta social del adulto, no solo será importante la relación que se estableció con la madre sino también la experiencia con sus congéneres. La complejidad y variabilidad del medio ambiente también afectará en gran medida al desarrollo de la conducta exploratoria y la capacidad de aprendizaje. Existen dos aspectos importantes de la conducta que determinan la capacidad del adulto para adaptarse a los desafíos ambientales. Uno es en el periodo más o menos limitado o sensible en la ontogenia, durante el cual cierta conducta se puede ver afectada por factores ambientales. Un claro ejemplo de la importancia de dichos periodos sensibles de la vida es la *impronta troquelado*. Se trata del aprendizaje y la consolidación a largo plazo de la importancia de ciertos estímulos (congéneres, alimento) y de la orientación de la conducta hacia ellos. Ciertos animales deben seguir a sus padres desde que nacen para sobrevivir (como las aves) y se manifiestan a la llamada específica de su especie la cual actúa como

un estímulo acústico y la respuesta es el seguimiento. Es allí cuando estos animales hacen impronta con sus progenitores y aprenden a distinguirlos de otros adultos.

El otro es el periodo limitado durante el cual se desarrollan las pautas de conducta. Modular la conducta más allá del periodo sensible es difícil y a veces imposible. Por ejemplo si no hay juegos de monta durante el primer año de vida en ciertas especies de monos, tendrán dificultades cuando adultos para desarrollar una conducta sexual normal, al igual que la conducta agonística de algunas especies también parece depender de juegos de lucha desarrollados en los primeros años de vida. La privación de congéneres o falta de espacio para entablar relaciones sociales, tiene como resultado pautas de conducta anormales que afectan seriamente a los grupos sociales (Halliday T.R. & Slater PJB, 1983).

Una cuestión importante para la investigación animal es cómo alojar los animales experimentales teniendo en cuenta no sólo los requisitos del experimento sino también las condiciones ambientales que son necesarias para el propio animal con relación a su especie y a los hábitos específicos individuales. Los experimentos sobre privación muestran que los animales criados en condiciones en las que carecían de estímulos (sociales) presentan graves problemas a la hora de enfrentarse a otros problemas cuando son adultos. Por ejemplo, las experiencias de privación social en ratas jóvenes provocan que los animales cuando adultos no puedan responder a los signos de comunicación especie específicos (Douglas L. y col. 2004). Por lo tanto, para la cría de animales se deben satisfacer ciertas condiciones de la especie y específicas de la cepa. Sólo en dichas condiciones los

animales serán capaces de desarrollar su total capacidad para enfrentarse a los desafíos ambientales.

La relación de los animales con su medioambiente es tal que un tipo de conducta está íntimamente relacionado con una ubicación concreta. Un animal se familiarizará con su entorno por medio de una conducta exploratoria antes de empezar a alimentarse o a defender el área. De hecho, un medio ambiente no familiar producirá respuestas fisiológicas (endocrinas) que no se pueden distinguir de las producidas por otros estímulos de alerta o incluso dolorosos como débiles descargas eléctricas (Calhoun J.B, 1962). Por medio de la exploración de su medio ambiente, el animal desarrolla una especie de mapa neural. El concepto de mapas cognitivos fue introducido para explicar este fenómeno indicando que la conducta de los animales en su propio territorio no sólo está guiada por reflejos y hábitos simples sino que también está dirigida por un conocimiento del medio ambiente (Tolman, E. C., 1948). En la actualidad se reconoce que los animales desarrollan un conocimiento detallado de la estructura espacial de su medio ambiente. La principal estructura nerviosa central involucrada en este mapeo cognitivo en los vertebrados es el hipocampo. En esta estructura cerebral, las neuronas responden con relación a la ubicación del animal en su medio ambiente, con independencia de su conducta en dicha ubicación. Este conocimiento del medio ambiente depende de las capacidades específicas de cada especie. Von Uexküll (1921) llamó a todos los aspectos del medio ambiente que se pueden percibir y aquellos que pueden ser influenciados por un individuo, el *Umwelt* del organismo. Se trata del mundo perceptivo específico de

especie. Dos individuos de distinta especie en un mismo medio, lo perciben diferente, porque tienen *umwelts* diferentes.

Según éste, el animal adquiriría un ambiente subjetivo que contendría sólo ciertos estímulos-clave ambientales, los de importancia para el desenvolvimiento de sus actividades vitales, y que desencadenarían el mecanismo interno de ejecución del comportamiento. El *Umwelt* de un animal no es comparable al nuestro y por lo tanto cambios que parecen de poca importancia en un sistema de alojamiento (la ventilación, la higiene, el cuidado, etc.) producen con frecuencia un efecto drástico en los animales.

Los sistemas perceptivos (órganos de los sentidos más áreas cerebrales involucradas) han evolucionado de manera específica de especie, optimizando su funcionamiento para los ambientes y las necesidades del ambiente ancestral de selección. Así, que dos individuos de distinta especie respondan a las mismas condiciones (percibidas por nosotros) no significa que estén empleando sistemas sensoriales idénticos, o circuitos de procesamiento iguales. A estos mundos perceptivos inconmensurables (incomparables) los llamamos *Umwelt*.

La percepción, en el tema del bienestar animal, tiene otra faceta relevante. Según Wemelsfelder (1997) el comportamiento no es el resultado, sino la fuente de la percepción; lo que se percibe del ambiente externo depende de las capacidades comportamentales y las opciones disponibles. Este autor toma de Gibson el término asequible (*affordance*) para indicar la naturaleza relativa al comportamiento de la percepción. Por ejemplo, nuestra respuesta al agua depende de cada situación (baño, barrera a cruzar, bebida); lo que percibimos, en el sentido más directo de la

palabra, no es sólo agua, sino lo que el agua nos permite hacer. De manera que, no son las propiedades específicas del estímulo lo que cuenta, sino lo que le permite hacer a un animal. La percepción de variabilidad y complejidad no es automática, sino que depende del compromiso activo del animal con su ambiente.

Su comportamiento va descubriendo la variabilidad inherente al ambiente. Esta interacción debe ser voluntaria. Es sólo cuando se le da la oportunidad de moverse libremente, que los animales pueden explorar los distintos aspectos del ambiente. Cuando se los introduce a la fuerza en un ambiente, es más probable que la respuesta sea de retirada o huída. Sugiere que no es estrictamente cierto decir que toda estimulación “es” variable. Que lo sea o no depende de la perspectiva comportamental del animal. En otras palabras, la organización del comportamiento es más de naturaleza respuesta-estímulo, que estímulo-respuesta.

La implicancia para nuestro tema, es que el diseño de los ambientes debe basarse en el comportamiento, y no en los estímulos. No podemos saber qué significan para un animal los distintos aspectos del ambiente. Todo lo que necesitamos, es saber que le permite funcionar creativamente (sic).

Para los animales de experimentación como los ratones y ratas, los olores son un componente esencial de su *Umwelt*. Los cambios en las pautas de marcas olorosas en su medio ambiente producen reacciones en los animales, similares a las suscitadas por otros factores desconocidos. A su *Umwelt* pertenecen tanto los aspectos físicos como los sociales, destacando la relación entre los individuos de una especie. Dichas relaciones son evidentes ya que algunos animales buscan el contacto con unos mientras que las evitan con otros. La forma en que esto funciona

con frecuencia trasmite la idea de que los animales se conocen entre ellos, como se ilustra en la relación madre-hijo. Está claro que existe un vínculo entre los dos que no sólo contribuye a la lactancia y la seguridad de la cría sino a reducir el estrés. Cuando se rompe este vínculo, aparecen diversas expresiones emocionales tales como agitación de la conducta y estrés neuroendocrino, tanto en la madre como en la cría.

Aparte de estas relaciones materno-filiales, pueden existir relaciones entre animales que son estabilizadoras, como en las especies de elección monogámica de parejas; o por contraste en las especies con parejas no armoniosas que tienen que ser separadas para prevenir graves patologías relacionadas con el estrés. Esto es fundamental cuando se forman grupos de animales y se colocan en una jaula. Las diferencias individuales en un grupo pueden ser tan grandes que no permitan mantener esa composición específica. En verdad, poco se sabe sobre los factores involucrados en la estabilidad de los grupos sociales y es posible que la distinción entre los tipos de individuos (sujetos activos o pasivos) juegue un rol importante para el desarrollo de una jerarquía social.

También existen factores estabilizadores o desestabilizadores en la relación entre los animales y el hombre; y todas estas relaciones sociales entre animales y entre estos y los seres humanos pueden ser de importancia para la salud y bienestar de los animales.

Los animales no sólo tienen conocimiento de los aspectos espaciales de su medio ambiente, sino también de la forma en la que los sucesos se preceden y se suceden. En el condicionamiento por estímulo, permite que el animal pueda predecir

ciertos sucesos en su medio ambiente, por ejemplo la entrada de un cuidador predice la llegada de comida. Por otra parte en el condicionamiento operativo, el animal aprende qué conducta producirá cambios significativos en su *Umwelt*, como obtener comida o evitar a un rival. Este razonamiento implica que los animales presentan expectativas sobre los sucesos futuros, aunque no siempre se cumplan.

Para introducirnos en la problemática del estrés, observaremos que juegan un papel importante otros aspectos como son la *controlabilidad* (capacidad de control) y la *predictibilidad* (capacidad de predicción), fundamentales en la investigación moderna del estrés. Lo que determina la gravedad de los síntomas de estrés es la capacidad de controlar o predecir un estresor y no sólo el estresor en sí mismo. De los experimentos de predictibilidad y controlabilidad en rata de Weiss, 1972 se pueden formular las siguientes definiciones de estrés:

Estrés agudo: es el estado en el que se encuentra un organismo después de una disminución repentina en la predictibilidad y/o controlabilidad de los cambios ambientales relevantes.

Estrés crónico o diestrés: es el estado en el que se encuentra un organismo cuando aspectos ambientales relevantes tienen baja predictibilidad y/o no son controlables o muy controlables durante un largo periodo de tiempo.

Distinguir predictibilidad de controlabilidad es importante. La predictibilidad está asociada al condicionamiento por estímulo y la controlabilidad al condicionamiento operativo. La controlabilidad implica en sí misma predictibilidad, mientras que lo contrario no siempre es cierto. Por ejemplo los animales en ciertos sistemas de

alojamiento pueden ser capaces de predecir la recepción de comida con facilidad, pero este suceso puede estar totalmente fuera de su control. La ausencia de control sobre un aspecto de la vida tan importante como el alimento puede ser un factor relevante que produzca estrés en algunos sistemas de alojamiento.

En el marco de la teoría sistemática del estrés de Jensen – Toates, (1997) consideran al mismo como un estado en el cual el sistema motivacional de un individuo que normalmente está cerrado se encuentra en un modo abierto sin resolución. Los autores proponen una integración fisiológica y psicológica que conllevan a la situación de estrés; y no solamente fisiológica y que los parámetros de medición fisiológicos como por ejemplo el cortisol, por sí solos no indican siempre una situación de estrés. Para ellos el estrés se produce como consecuencia de una estimulación adversa externa y de factores causales internos los que dirigen al animal a que desarrolle un comportamiento específico de especie.

Cuando nos referimos a las conductas conflictivas y su relación con el estrés, al definir estrés agudo como un estado inducido por una situación de mayor incertidumbre, es posible que dichas situaciones produzcan un tipo de conflicto. Las situaciones de conflicto forman parte de la vida diaria y las conductas conflictivas que las acompañan se encuentran en un grupo que incluye ciertas conductas agonísticas, ambivalentes, redirigida y accesorias o de desplazamiento.

La conducta agonística según King & Gunney (1954) se define como la incitación a luchar; incluye a todas las conductas asociadas con el conflicto, incluyendo comportamientos desde la huida hasta la sumisión. La conducta ambivalente se da cuando un organismo tiene tendencia tanto a aproximarse como a evitar un objetivo,

por ejemplo cuando el animal se encuentra en el borde de un territorio y demuestra conductas de agresión y de huida. La conducta redirigida se observa cuando un organismo no puede alcanzar un objetivo y desvía su conducta hacia otro objeto u individuo, por ejemplo en los cerdos de producción al no poder desarrollar la conducta exploratoria. Estas conductas conflictivas se identifican por el hecho de que su duración es corta y su intensidad exagerada, lo cual es típico de las situaciones de estrés agudo. En una situación en la que dichos conflictos no se pueden resolver y que son de una naturaleza más permanente se producirá un estrés crónico. Por lo tanto las conductas conflictivas originales se transformarán en conductas desviadas. Las formas patológicas de conducta más conocidas son las pautas estereotipadas y las conductas dañinas para el propio animal o sus congéneres (Van Zutphen y col., 1993). Las conductas dañinas como la que se da en los ratones que se muerden el pelo los unos a los otros parecen proceder de una conducta redirigida en donde el animal no puede alcanzar un objetivo o le tiene miedo y la conducta se dirige hacia otro objeto sustitutorio. Aunque el origen de estas conductas no siempre se conoce, se considera que son indicativas de graves deficiencias respecto del cuidado y alojamiento de los animales.

El concepto de estereotipia es más difícil de definir. Mason (1991) considera que clasificar un comportamiento como estereotipia es complejo ya que no hay consenso entre diversos autores a cuál de diferentes pautas comportamentales le corresponde el nombre de estereotipia. Esto se debe a los diferentes métodos utilizados para describir el comportamiento como tal, y también a las dificultades interdisciplinarias de comunicación donde la palabra estereotipia significa diferentes cosas (Oderberg,

1993). ¿Puede afirmarse que los comportamientos estereotipados que observamos en el balanceo de primates privados maternalmente, o el comportamiento de paseo de los leones enjaulados o el morder los barrotes de las cerdas atadas son causados por los mismos factores? La decisión de clasificar a un modelo de comportamiento como estereotipado depende de cómo ese comportamiento es realizado, y si siempre se da de una manera invariante y repetitiva. Lo que siempre fue llamativo acerca de los estereotipos estudiados es que parecen no tener función, lo cual implicaba cierto grado de “anormalidad”, y fue justamente esto, por lo cual muchos investigadores interesados en el bienestar incluyeron esa anormalidad en la decisión de si cierto tipo de comportamiento pudiese ser considerado estereotipia. También algunos autores (Jeanette Kroshko y col., 2016) trabajando con carnívoros salvajes, en su búsqueda de encontrar mejores conductas indicadoras y que puedan tener algún significado cuando no se realizan debido al cautiverio, y puedan llevar a desarrollar un comportamiento estereotipado; afirman que la territorialidad y ser individuos altamente activos en la naturaleza no parecería predecir que en cautiverio desarrollen un comportamiento estereotipado. Lo mismo sucede si los individuos son muy o poco inteligentes (estimado por el volumen craneal) tampoco se convierten en buenos predictores de que desarrollen estereotipia por lo que más estudios son necesarios. Lo que si dejan en evidencia es que mientras la presencia de un comportamiento estereotipado indica condiciones de pobre bienestar, la ausencia de comportamientos estereotipados no garantiza buen bienestar.

En relación a la capacidad de enfrentamiento y diferenciación individual, Wechsler (1995) afirma que tanto los animales de granja como los de experimentación,

mantenidos en alojamientos intensivos se encuentran confrontados con situaciones aversivas en la mayoría de las ocasiones y no tienen la posibilidad de evitar un estímulo aversivo mostrando una reacción específica. Si la situación aversiva no cesa, el animal usa una serie de estrategias de comportamiento en un intento de enfrentarse con ese medioambiente.

Cuando se analiza si un animal puede controlar su entorno con éxito, es decir, si puede enfrentarse a las demandas ambientales, depende de los mecanismos que el animal tiene disponibles para afrontar el desafío ambiental y de la evaluación individual de ese contexto. Cuando se considera que el escenario va a amenazar la homeostasis (predictibilidad), se activan los mecanismos disponibles para enfrentarse a dicha situación o controlarla. Tanto la evaluación de esas condiciones como los mecanismos disponibles para enfrentarlos dependerán del genotipo y fenotipo del individuo.

Parte de este intento de controlar es lo que llamamos "*Coping*": Es la respuesta comportamental que tiende a reducir el efecto del estímulo aversivo sobre el estado físico del organismo o las medidas fisiológicas relacionadas al estado físico. La definición implica que la percepción del animal ha sido moldeada por la evolución para reconocer la situación aversiva o amenazante para el individuo. Si la situación aversiva a la cual los animales se enfrentan en un experimento o alojamiento es diferente de la situación aversiva que ellos encuentran en su medioambiente natural, o de la que moldeó la respuesta en el ambiente ancestral de selección, es posible que su organización comportamental carezca de una respuesta comportamental adaptativa y que no puedan hacer coping frente a esa situación.

En ratas y ratones se dan dos comportamientos extremos. Un grupo de animales reacciona con una pauta de enfrentamiento activo caracterizada por intentos de controlar el medio ambiente, ya sea defendiendo el territorio propio, huyendo ante la presencia de un animal dominante y en la evitación, por ejemplo, de una descarga (Weiss, 1968). Este tipo de respuestas al estrés fue descrito en un principio como la respuesta lucha-huida.

En otras situaciones el animal puede actuar contra ese estímulo aversivo y tratar de removerlo (Korte y col. 1992), por ejemplo las ratas tienden a acumular el lecho de la caja contra un borne electrificado luego de experimentar un shock eléctrico contra este.

Una segunda pauta de enfrentamiento se caracteriza por una aceptación pasiva de la situación. Por ejemplo, los animales no defenderán el territorio, se quedarán petrificados cuando se les acerque un dominante y serán poco eficaces a la hora de evitar los estímulos adversos

Esta conducta pasiva de enfrentamiento también es llamada respuesta de conservación-alejamiento. Ambas conductas pueden parecer soluciones alternativas a un problema pero ambas pueden conducir a cierto control ambiental. Ejemplo, para evitar el ataque de un macho dominante, tiene a corto plazo el mismo efecto el escape activo o el esconderse con cautela en la esquina de la jaula.

Los animales que emplean una conducta de enfrentamiento activo suelen ser enérgicos en su grupo social y pueden encontrarse en posición dominante o subdominante. Los que presentan una pauta de enfrentamiento pasivo suelen ser los subordinados del grupo. Así, la diferenciación individual está presente, y el nivel

en que esta diferenciación se ve expresada en cautividad dependerá de la capacidad del sistema de alojamiento para permitir grupos sociales. Son muy importantes los factores como el tamaño y composición del grupo, la proporción entre sexos y el espacio disponible del habitáculo.

Es importante destacar que las relaciones sociales siempre contribuirán a la variación existente entre los animales experimentales, y que dicha variación no solo será de naturaleza cuantitativa sino también cualitativa. Reducir esa variación natural implicará una forma de selección de los resultados experimentales.

Si la situación aversiva consiste en la ausencia de un estímulo que libera un comportamiento específico, por ejemplo alimentarse, la respuesta de coping será la búsqueda del alimento.

Si un animal no puede ni escapar ni remover un estímulo aversivo no repetirá las mismas estrategias de respuestas de coping. Como alternativa el animal puede conservar energía y esperar por un cambio espontáneo en la situación aversiva. Por ejemplo, se halló que en perros expuestos a un shock eléctrico en una situación de la que no podían escapar, en situaciones posteriores fallan en la respuesta de escape cuando la situación permite una posibilidad de huida.

Como una situación aversiva también puede ocurrir en un ambiente natural, Wechslersugiere que las estrategias de coping que se encuentran en animales de laboratorio y granjas forman parte de su repertorio normal de comportamiento. Las estrategias “escapar”, “remover” y “esperar” han evolucionado probablemente para manejar los desafíos con conspecíficos y confrontarse con los predadores.

Moberg (1985) pone en discusión el comportamiento de escape como respuesta adaptativa para reducir el estrés de un animal frente a un desafío con otro congéne-re dominante. Benus y col. (1991) argumentan que una estrategia pasiva como es “esperar”, está basada en la posibilidad de que un animal pueda permanecer indetectado y que la fuente de amenaza abandone esa área por sí misma. Las situaciones naturales que pueden haber sido favorecidas por la evolución como la estrategia de búsqueda se caracterizan por la ausencia de recursos esenciales como agua o alimento.

Muchas publicaciones acerca de comportamiento de coping en animales enfatizan solamente la distinción ya vista entre dos estrategias; el coping activo y el pasivo (Von Holst, 1985; Koolhaasy col., 1986; Bohusy col., 1987; Wiepkema and Schouten, 1990; Benusy col., 1991; Kortey col., 1992). Esta clasificación ha estado influenciada por los resultados fisiológicos.

El coping pasivo en animales generalmente se produce como reacción ante un estímulo aversivo mediante la inmovilidad, esperando que la situación amenazante cambie.

El coping activo, por el contrario adopta varias estrategias, Benus y col. (1991) postulan que el estilo de coping activo en roedores machos está dirigido a la eliminación de la fuente de estrés o la eliminación de la propia fuente de amenaza condicionándose con las estrategias mencionadas de escapar o remover.

Como el uso de estas estrategias dependen de cada especie y varían según la situación aversivo a la cual el animal se enfrenta, es muy prematuro generalizarlo como teoría de estilos de coping activos o pasivos.

Existe una relación del coping con las condiciones de alojamiento: la organización conductual de los antepasados de nuestros animales domésticos ha sido formada por selección natural. Los sistemas de alojamiento intensivos para los animales de granja y de laboratorio probablemente no cumplan con las 'expectativas' de una organización conductual que ha evolucionado en un entorno diferente (Wechsler, 1992b). Estos sistemas de alojamiento ofrecen al animal un ambiente estéril que no provoca comportamientos variables y diferenciales. Estos involucran pocas características que pueden ser manipuladas y cambiadas por el comportamiento del animal. Aunque los animales pueden crecer y reproducirse bien en estos sistemas, son propensos a tener problemas conductuales para hacer frente a situaciones aversivas que se encuentran en dicho entorno.

En estas condiciones de alojamiento los animales son propensos a desarrollar comportamientos "anormales" dado que fallan al hacer frente a situaciones aversivas cuando desarrollan su comportamiento "normal". También parece razonable asumir que el comportamiento anormal se pueda originar a partir de un comportamiento de coping, aunque hay pocos estudios detallados que ilustren la transición de un comportamiento de coping no exitoso en un comportamiento anormal.

Por "comportamiento anormal" hacemos referencia a que es algo que no sucede en la naturaleza, y por "comportamiento normal" a aquellas adaptaciones flexibles y activas del individuo a circunstancias o estímulos ambientales externos. En un ambiente de laboratorio estéril, sin estimulación ambiental, es altamente probable que se desarrolle ese tipo de comportamientos anormales (Wemelsfelder, 1994).

Broom (1991), postula que el bienestar es pobre cuando los individuos tienen dificultad en hacer frente con su entorno. Esta dificultad puede ser evaluada por mediciones fisiológicas de estrés, inmunología, enfermedad, heridas, mortalidad, crecimiento y reproducción, y también por mediciones de comportamiento. Un animal con dificultad de hacer frente a su entorno puede aumentar la duración, la frecuencia o intensidad de un comportamiento de coping dado. Probablemente pueda evaluar una variedad de estrategias de coping y la falla al hacer frente con ese comportamiento normal resultara en el desarrollo de un comportamiento anormal.

En orden de prevenir un pobre bienestar, los sistemas de alojamiento deberían ser diseñados para permitir a los animales realizar comportamientos de coping efectivos cuando se enfrentan a situaciones aversivas.

¿Cuál es la significación funcional de las respuestas fisiológicas ante el estrés? Los parámetros fisiológicos como el incremento de catecolaminas o corticosteroides en plasma se utilizan con frecuencia como indicadores de una carencia de bienestar animal. Sin embargo, se debería tener en cuenta que estas respuestas son adaptativas y necesarias para el organismo cuando tiene que enfrentarse a las condiciones (estresantes) y para sobrevivir a esa situación.

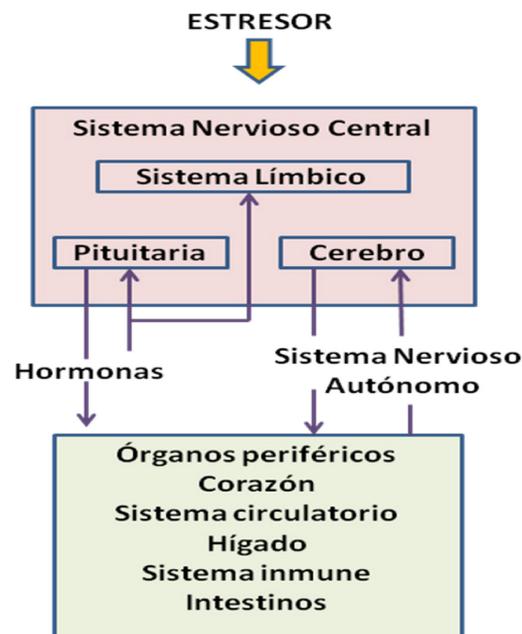
Los cambios fisiológicos que se producen como reacción ante un estímulo estresante son importantes en dos niveles organizativos del organismo. Tanto el sistema nervioso autónomo (SNA) como los diferentes sistemas neuroendócrinos afectan a órganos periféricos tales como el corazón, los vasos sanguíneos, el sistema inmune, etc. En general, se puede decir que la función que desempeñan es la de preparar procesos fisiológicos tales como la presión sanguínea, la distribución

de la sangre, el metabolismo, la inmuno competencia, etc. para producir una respuesta conductual y fisiológica adecuada. También se ve afectado el sistema nervioso central (SNC), en el cual distintas hormonas, tales como los esteroides, cruzan la barrera hematoencefálica y se unen a receptores específicos en ciertas áreas del cerebro, y otras hormonas a través de receptores específicos situados sobre las fibras de los nervios autónomos aferentes. Esta retroalimentación de hormonas hacia el SNC tiene varias funciones, en lo que se refiere a hipotálamo y pituitaria, está relacionado con mecanismos neuroendocrinos clásicos de ida y vuelta. Sin embargo, cuando se refiere a estructuras límbicas superiores como el hipocampo y la amígdala, las hormonas pueden afectar a la conducta. También se sabe que muchas hormonas que se liberan como reacción ante un estresor, como la adrenalina, corticosterona, vasopresina, endorfina, etc., afectan tanto el aprendizaje como los procesos memorísticos. Por lo tanto, estos mecanismos fisiológicos y neuroendócrinos se pueden considerar como los mecanismos básicos que subyacen a todo tipo de conducta, y sólo se pueden utilizar como parámetros indicativos del trastorno del bienestar animal cuando muestran desviaciones prolongadas de los valores normales.

En esta interacción entre medio ambiente y fisiología, la conducta es un medio importante para obtener y mantener la homeostasis del medio interno. Sin embargo, los procesos fisiológicos también desempeñan un papel importante. Por ejemplo, cuando se sitúa un animal en un medio ambiente frío, reducirá su pérdida de calor no solo construyendo un nido sino también reduciendo su circulación sanguínea periférica e incrementará su producción de calor tiritando e incrementando su

metabolismo. Por lo tanto, un desafío ambiental (estresor) siempre inducirá una respuesta muy integrada conductual y fisiológica. Esta respuesta integrada se inicia y coordina por el sistema nervioso central (SNC). El SNC tiene a su disposición dos vías principales como son el sistema nervioso autónomo y el sistema neuroendocrino.

FIGURA 1- Relación entre el sistema nervioso central con el sistema nervioso autónomo y el sistema neuroendocrino



El sistema nervioso autónomo presenta un subsistema simpático y otro parasimpático y todos los órganos están inervados por ambos. Los dos subsistemas se encuentran activos en la reacción ante un estresor, y se equilibran en su actividad. Por ejemplo, el manejo de un animal provoca un incremento de actividad cardíaca y catecolaminas en plasma, indicando un incremento de la actividad simpática. Cuando más tarde se coloca al animal en una jaula donde antes había

experimentado un suceso adverso, puede que se produzca una disminución repentina de la frecuencia cardiaca incluso aunque los niveles de catecolaminas en plasma hayan continuado elevándose. Esta bradicardia se debe a un incremento de la actividad parasimpática y desaparece cuando se bloquea la neurotransmisión colinérgica por medio de atropina. Esto muestra el equilibrio de ambos componentes del sistema nervioso autónomo y también como pueden activarse de manera separada por estresores específicos.

A su vez, el sistema nervioso forma parte de otro más vasto y diverso: el sistema neuroendocrino. El sistema hipotálamo-hipofisario (hipotálamo-pituitaria-adrenocortical - HPA) determina la respuesta neuroendocrina a los estresores, lo que llevo a formular la propuesta del Síndrome General de Adaptación (SGA), en el cual cuando un animal está expuesto a un estresor en forma crónica se presentan 3 fases diferentes. La primera fase es la de alarma la reacción fisiológica directa al estresor, después de un tiempo esta fase se transformará en la segunda que es de resistencia. Aquí el animal adapta su fisiología a la presencia continua del estresor. En la tercera fase, llamada de agotamiento, el sistema se encuentra exhausto, por su exposición continua a estresores severos. En este último caso, la capacidad fisiológica del animal no es suficiente para satisfacer las demandas ambientales y fallecerá. Estas condiciones se ven claramente en situaciones de estrés crónico. En las condiciones de alojamiento en las que se encuentran los animales de laboratorio, estas situaciones extremas pocas veces se dan. Por ello es que la investigación actual se centra más en la actividad pituitario-adrenocortical en la reacción ante desafíos ambientales menos severos. La actividad HPC se relaciona con la

predictibilidad y controlabilidad del estresor que provoca que la pituitaria secrete la hormona adrenocorticotropa y activa la corteza adrenal para la liberación de corticosterona. Pero también ante el estrés muchos sistemas neuroendocrinos responden además de las adrenales, como es la reproducción con la liberación de distintas hormonas (FSH, LH, testosterona, estrógenos, prolactina); con el metabolismo (H. del crecimiento, tirotrópina, tirosina, insulina), y la regulación de la presión sanguínea y fluidos corporales (vasopresina, oxitocina).

Las actividades orientadas al control del ambiente del bioterio, como la temperatura ambiente, la humedad, los cambios de aire, la frecuencia de limpieza de las jaulas, los ciclos de luz - oscuridad, el ruido y las rutinas diarias, son ejemplos de condiciones ambientales que al producir estrés afectan el bienestar de los animales en una institución de investigación (Clough, 1982; Gamble, 1982; Riley, 1975; Peterson, 1980; McSheehy, 1983; Everitt, McLaughlin y Helper, 1987; Besch, 1980; Gärtner, Büttner, Döhler y col. 1980; Anon, 1990).

Distintas investigaciones apoyan esta afirmación. Se observaron variaciones importantes en ciertos parámetros sanguíneos de ratas sometidas a diversas manipulaciones y procedimientos de experimentación. Por otra parte, la presencia de un miembro del personal familiar en la sala, sin que haga manipulaciones, tenía muy poca influencia sobre los parámetros estudiados (Gärtner, Büttner, Döhler y col. 1980). Cambios súbitos en la humedad pueden causar muchos problemas a los conejos (Anon, 1989b).

En conejos y roedores de laboratorio, se detectaron estímulos y condiciones que pueden afectar su bienestar psicológico y su salud general. No está permitido, bajo

ninguna circunstancia, practicar procedimientos experimentales que necesiten un contacto físico en las salas donde viven los animales, sobre todo si estas manipulaciones provocan miedo y/o emisiones vocales.

Un factor que actúa como estresor es el ruido. Se considera que los niveles de 50-70 dBA o más son probablemente nocivos para el oído de los roedores y conejos. Estos efectos incluyen crisis audiogénicas en ratones jóvenes (Bevan, 1955; Gamble, 1982), y baja fertilidad en ratones y ratas (Newton, 1978).

Lo mismo ocurre con la iluminación. La intensidad lumínica puede influir las actividades de los roedores, el comportamiento maternal y varios otros aspectos de fisiología reproductiva (Clough, 1982). Se observaron desordenes reproductivos en ratones y ratas alojados con ciclos de luz - oscuridad inapropiados, o en la ausencia de tal ciclo (Newton, 1978). En ratas albinas, la exposición continua a una intensidad luminosa mayor de 700 lux puede ocasionar una degeneración severa de la retina (Clough, 1982; Semple-Rowland y Dawson, 1987), y hay otros informes de daños retinianos asociados con la iluminación (McSheehy, 1983).

1.7 ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL

En el pasado, se consideraba particularmente importante proveer un alojamiento adecuado para los animales de laboratorio, a fin de asegurarles buenas condiciones de higiene, facilitar su manejo y minimizar variables (de manejo). Hoy en día se da más importancia a reducir el estrés del animal, a mejorar su bienestar social y la expresión del comportamiento. El hecho de agregar diversos elementos de enriquecimiento ambiental puede o no resultar en un incremento de los costos de la

actividad; sin embargo y a menudo hay beneficios inmediatos para el animal y, finalmente, para el investigador y la investigación.

El enriquecimiento ambiental es definido por Beaver (1989) como "elementos adicionales al ambiente de un animal con los cuales puede interactuar."

Newberry (1995) lo define como una mejora en el funcionamiento biológico de los animales cautivos, resultante de modificaciones en su ambiente. La mejora en la funcionalidad biológica incluye el éxito de su vida reproductiva, aumento de su eficiencia inclusiva y las consecuencias de esto como mejora de su salud.

En regla general, la mayoría de los animales de experimentación son animales sociables y se benefician de la compañía de sus congéneres o del humano. Las experiencias de un animal durante sus fases de desarrollo determinan su comportamiento social. Por lo tanto, las condiciones de alojamiento de un animal en una instalación de crianza tendrán un impacto sobre su bienestar futuro.

Se deben hacer las mismas consideraciones sobre las necesidades sociales de los animales usados en la investigación, en la enseñanza o en pruebas, como sobre los factores ambientales tales como la iluminación, la calefacción, la ventilación y la contención (jaulas). Particularmente en el caso de animales alojados individualmente, la observación diaria provee una forma alternativa de contacto social para el animal, y usualmente facilita las manipulaciones, pues el animal se acostumbra a la presencia del humano.

En un ambiente más complejo, el uso de dispositivos específicos, y el uso mejor del espacio existente, tienen efectos estimulantes. El simple hecho de aumentar el

número de centímetros cuadrados disponibles para un animal no favorece por sí mismo una utilización mejor del espacio (Line, 1987; Fajzi, Reinhardt y Smith, 1989); sin embargo, el espacio debe convenir a la especie animal. En animales alojados en grupos, se debe evaluar regularmente la relación del grupo social y del espacio disponible.

¿Por qué se recomienda prestar tanta atención a la formación de grupos?

Una de las características de los ratones silvestres es que muestran una variación poblacional rítmica, aumentando hasta cierto nivel óptimo seguido de una declinación rápida y luego un óptimo nuevamente (Baumans 2002). En la mayoría de los laboratorios, los ratones se alojan juntos después del destete en grupos de un mismo sexo. Aunque esto no es natural, los machos forman jerarquías de todas maneras, proceso durante el cual puede haber peleas, estrés y heridas. Estas diferencias de agresión difieren marcadamente entre las distintas cepas de laboratorio (Nevisony col. 1999).

Cuando los animales entran en contacto, hay un período inicial durante el cual establecen sus relaciones sociales (rango de dominio, etc.). Se pueden producir interacciones agresivas; y cuando las condiciones son favorables, la organización social se estabiliza. Una vez establecida la jerarquía, las interacciones son sutiles, y basadas más sobre la evasión o la amenaza que sobre la acción agresiva manifiesta. Si su rutina diaria se desorganiza, si se limitan recursos tales como los alimentos o los espacios de descanso, o si los animales están mal agrupados, la jerarquía llega a ser perturbada y el número de interacciones agresivas se multiplica. El bienestar del animal está amenazado en lo social cuando:

- a) El espacio es insuficiente para mantener una distancia adecuada para el comportamiento;
- b) Los espacios de alimentación y de descanso para todos los individuos son insuficientes; o cuando la alimentación y el descanso no se pueden realizar concurrentemente;
- c) Los reagrupamientos son tan frecuentes que los animales experimentan repetidamente el proceso de estabilización;
- d) Los tamaños de los grupos no son apropiados para las especies.

Lo anterior cuestiona las prácticas intensivas de confinamiento que impiden a los animales ejercer sus actividades sociales y de comportamiento específicas de especie.

Además de su espacio mínimo de descanso, los animales necesitan también lo que se podría llamar el espacio secundario, que les permite libertad de movimiento. Una excepción importante puede ocurrir al momento del parto, cuando la mayoría de las hembras deben tener sus espacios propios.

Es fundamental evitar alojar animales individualmente, a menos que sea necesario por razones de salud, de agresión o de investigación. Los animales alojados solos deben tener algún grado de contacto social con otros de su especie. Para la mayoría de las especies, se debe permitir por lo menos establecer contacto visual. El contacto olfativo y auditivo con otros animales es también habitualmente deseable.

Beaver (1989) sugiere cinco factores en particular que pueden contribuir al enriquecimiento ambiental: el enriquecimiento del comportamiento, los congéneres sociales, los dispositivos, las actividades de busca de alimentos, y el control del ambiente. Algunos de estos factores se discuten más adelante.

Baumans (2004) y Berdoy (2002), sostienen que los roedores mantienen una vida parcialmente adaptada a la cautividad pero aún revelan similitudes con sus contrapartes silvestres. Por esta razón, el medio ambiente del animal de laboratorio debería acomodarse a las necesidades comportamentales y fisiológicas innatas tales como contacto, descanso, construcción de nido, refugio, explorar, ocultarse, forrajeo y roer.

Por ejemplo, los roedores son muy susceptibles a los predadores y es muy común que muestren fuertes respuestas de miedo en situaciones no familiares cuando no pueden hallar refugio. Muestras de este comportamiento incluyen tendencia a huir, morder cuando son manipulados o quedarse totalmente inmóviles para evitar ser detectados. El animal debería poder sentirse seguro en un ambiente amenazante que pudiera controlar (Poole, 1998).

Según Young (2003) para mejorar el bienestar de los animales y enriquecer el ambiente se emplean diferentes métodos que incluyen desde la mejora en la convivencia social hasta juguetes.

La implementación de un enriquecimiento ambiental específico debe considerar los siguientes principios:

- Mejorar la calidad del cautiverio de manera que el animal tenga una elección mayor de actividades y controles sobre el medioambiente social y espacial (Newberry 1995, Stauffacher 1995).
- Aumentar la diversidad comportamental.
- Reducir la frecuencia de comportamientos anormales.
- Incrementar la utilización positiva del ambiente.
- Aumentar la habilidad del animal para que pueda adaptarse a los desafíos (Young 2003)

Según Poole (1998) los animales tienen necesidades fisiológicas y comportamentales. Entre las fisiológicas se incluyen beber, comer, dormir y refugio. Entre las comportamentales se incluyen pautas tales como las de comportamiento social, exploración, forrajeo, acicalado, excavación, construcción de nidos, búsqueda de refugio y roer, fundamentales para el mantenimiento fisiológico normal y psicológico. Estos comportamientos son considerados como normales en los roedores en la naturaleza, y deben ser considerados como comportamientos innatos esenciales, que se realizan con independencia de sus efectos.

Para los animales de laboratorio, está reconocido que la interacción social con los congéneres es un factor de bienestar deseable y esencial. Existe abundante bibliografía que, desde hace años, respalda esta afirmación.

Idealmente los ratones alojados juntos debería ser compañeros de camada pero a veces esto no es posible debido a los diseños experimentales y tamaño de las cajas. Pero lo importante es que el grupo debe ser estable y armonioso (Love 1994; Morton y col. 1993; Stauffacher, 1997a), aunque esto conlleva a disponer de barreras visua-

les o refugios para ocultarse y evitar las agresiones (Stauffacher 1997b, 2000; Van de Weerd and Baumans 1995; Van Loo y col. 2002). Un conoespecifico para un animal social, es el factor de enriquecimiento más estimulante. Mientras que los objetos de enriquecimiento son elementos estáticos y de interés solo para una actividad específica, un compañero social siempre crea nuevas e impredecibles situaciones a las cuales el animal debe reaccionar. Este tipo de enriquecimiento conlleva a incrementar los comportamientos de alerta y exploración, los mantiene ocupados y les provee además algún sentimiento de seguridad (Stauffacher 2000). Incluso el contacto con humanos, (técnicos y cuidadores) en el manipuleo a diario, entrenamiento y sociabilización, beneficia al animal y a los resultados de los experimentos debido a que esto los estimula cognitivamente y permite una interacción más positiva con los investigadores (Baumans 2004; Shepherdson 1998; Van de Weerd and Baumans 1995).

De aquí se desprende la importancia de incorporar en este estudio como enriquecimientos social el alojamiento de a tríos y ambos sexos de los ratones y como enriquecimientos físicos, uno del tipo refugio y otro del tipo juguete para que puedan refugiarse y roer un objeto.

El término juguete (una antropomorfización) es una generalización para muchos objetos. Objetos como cadenas, trapos, bloques de madera, objetos de goma, tubos plásticos, pelotas, etc. son empleados para este tipo de enriquecimiento. Algunos de estos parecen ser de más valor funcional para algunos animales que para otros, y puede haber diferencias en los miembros de un grupo respecto de esta valoración. La motivación subyacente es el juego (Newberry 1995).

El enriquecimiento físico (dispositivos artificiales) incluye recintos complejos y estímulos sensoriales y nutricionales. La estructuración del ambiente de la caja es más beneficiosa que la provisión de una gran área de superficie. Salvo para la actividad locomotora, los animales no usan ese espacio, en cambio sí emplean recursos y estructuras internas del área para comportamientos específicos. La mayoría de los roedores dividen su espacio de vivienda en áreas separadas para alimentarse, descansar y excretar. Tales divisiones también permiten a los animales controlar su ambiente incluso los niveles de iluminación. (Stauffacher 1997a, Townsend 1997). Estas divisiones pueden ser facilitadas por estructuras internas en la caja: tubos, estantes, cajas y material para nido, plataformas, etc.; lo que permiten crear áreas de escondite y ocultamiento.

1-8 ÉTICA EN EL TRABAJO CON ANIMALES DE LABORATORIO:

Para comenzar a hablar de ética en el trabajo con animales de experimentación podemos citar a Fraser (1999), quien nos trae una problemática que surge desde los años 70, en la cual nos plantea que tanto los científicos como los filósofos preocupados por la ética animal han estado trabajando esencialmente hacia el mismo objetivo: proveer un marco de referencia que nos ayude a comprender y articular nuestras relaciones con los animales de otras especies, y trasladar este entendimiento hacia una acción apropiada.

Pero científicos y filósofos encararon esta tarea por casi 20 años con ideas, aproximaciones, enfoques y vocabularios muy diferentes debido a la poquísima comunicación entre ambos campos de investigación, funcionando casi como “dos culturas diferentes”.

Algunos escritos de los mejores conocidos sobre ética crearon barreras para los científicos debido a que estos tendieron a:

- 1- Poner el foco solamente a nivel del individuo más que hacer algunas precisiones a nivel de la población, o del ecosistema o la especie.
- 2- Defender principios éticos simples más que balancear entre principios conflictivos.
- 3- Ignorar o desestimar la ética tradicional basada en el cuidado, responsabilidad y comunidad con los animales.
- 4- Buscar soluciones a través de la teoría ética con pequeños recursos o conocimiento empírico.
- 5- Incluir diversos grupos taxonómicos dentro de una categoría moral simple.
- 6- Proponer una solución única para diversas prácticas de uso de animales.

Además, algunos de los científicos se separaron de los eticistas por el hecho de que el sufrimiento y otras experiencias subjetivas de los animales no eran en aquel momento susceptibles de investigación científica y por la afirmación de que la ciencia podría medir el bienestar animal como si solo se tratara de un concepto puramente empírico.

Sin embargo, otros autores menos conocidos, trabajan en ética animal creando vínculos con el bienestar animal y apuntan hacia la investigación empírica para ayudar a resolver cuestiones de la ética animal. En algunos de sus enfoques:

- 1- Expresan preocupación moral por los animales, utilizando conceptos que se prestan al análisis científico.
- 2- Atribuyen valor a la atención tradicional y a la comunidad con los animales.
- 3- Reconocen la importancia del análisis empírico para discriminar entre buena y mala práctica de uso con el animal.
- 4- Consideran que diferentes grupos taxonómicos merecen diferentes tipos y niveles de preocupación ética.

Al mismo tiempo, la ciencia del bienestar animal se ha vuelto más compatible con los enfoques utilizados por algunos eticistas. Algunos científicos han reconocido y tratado de aclarar la interacción de normativas y elementos empíricos en la evaluación del bienestar animal, y muchos están intentando entender las experiencias subjetivas éticamente relevantes de los animales.

La creciente convergencia de los científicos y los enfoques filosóficos pueden conducir a un campo de estudio más integrado y a una mayor conciencia ya que ni la información empírica ni la reflexión ética pueden, por sí mismas, responder a preguntas sobre nuestra relación con los animales de otras especies.

La mejor manera de actuar éticamente con los animales de experimentación es cumpliendo con las 5 libertades fundamentales, garantizando:

1. Que no padezcan hambre ni sed merced a un fácil acceso al agua potable y a una dieta que garantice un nivel adecuado de salud y vigor.

2. Que no sufran molestias o incomodidad gracias a un entorno adecuado de confinamiento y con zonas de descanso cómodas.
3. Que no sufran dolor, heridas o enfermedades gracias a la labor de prevención y diagnóstico con tratamiento rápidos.
4. Que puedan expresar un comportamiento natural al disponer de suficiente espacio, instalaciones adecuadas y la compañía de animales de la propia especie.
5. Que no padezcan miedo ni angustia al disponer de condiciones y trato que eviten el sufrimiento.

A lo anterior, en el campo de la investigación, se agregan las 3 Rs de Russel y Burch, (reemplazo, reducción y refinamiento). Si bien el reemplazo y la reducción son imprescindibles, tal vez el refinamiento es la que mejor aplica a la ética diaria del trabajo con los animales; tratando de reducir a un mínimo absoluto la cantidad de sufrimiento impuesta a los animales que todavía se utilizan, asistiéndolos con la correcta anestesia, analgesia y cuidados; brindándoles mejores condiciones ambientales para que puedan lograr sus necesidades comportamentales y fisiológicas, garantizando las competencias y habilidades del investigador y resto del staff para el trabajo con los animales y mejorando el procedimiento experimental.

1-9 ESTADO DEL CONOCIMIENTO:

La ciencia de animales de experimentación, ha alcanzado grandes avances en los últimos años, hasta llegar a la situación actual de desarrollo en la que se exigen

animales definidos genética y microbiológicamente para emplearlos en pruebas de diagnóstico, investigación y control de calidad.

La actitud ética y la responsabilidad que implica trabajar con seres vivos ha dado lugar a una nueva iniciativa denominada “armonización”, mediante la cual se ha convocado a los expertos y que se han puesto de acuerdo para definir y establecer recomendaciones para el uso y cuidado de los animales de laboratorio, constituyendo este un capítulo de vanguardia dentro de la especialidad el cual estudia el comportamiento animal y evalúa su estado de bienestar. Estos estudios han generado documentos de referencia con recomendaciones de relevancia internacional. El enriquecimiento ambiental, constituye uno de los capítulos dentro de dichas recomendaciones.

El término enriquecimiento implica una mejora. Sin embargo, se aplica frecuentemente a cambios ambientales de diferentes tipos (p. ej.: sociales, físicos, sensoriales, alimentación, amaestramiento) más que al resultado, y algunos autores emplean la palabra enriquecimiento como un sinónimo de un aumento en la complejidad.

El uso de enriquecimiento ambiental ha sido propuesto en diversos países del mundo desde principios del año 1980 como una acción para mejorar el bienestar de los animales de experimentación mantenidos en cautiverio en los bioterios (Kornerup - Hansen 1999). Asimismo, en muchos de ellos, la legislación ha incorporado este tópico como una exigencia para el cuidado y uso de los animales que se emplean en el desarrollo de las investigaciones científicas (Council of Europe 1997, Rodent Refinement Working Party 1998). En nuestro país, la ciencia de los animales de

laboratorio no ha alcanzado un desarrollo significativo en algunas de sus ramas, entre ellas los aspectos referidos al enriquecimiento que se les debe brindar a los animales para que alcancen su bienestar. Argentina no cuenta a la fecha con una ley para el cuidado y uso de los animales de experimentación; sin embargo, en distintos ámbitos académicos, institutos de investigación, laboratorios tanto públicos como privados se ha comenzado a dar importancia a la actitud y la forma en que se mantienen, producen y utilizan los animales de laboratorio. Da cuenta de ello, la creación de los denominados comités de ética y bienestar para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (CICUAL). En los mismos se contemplan los distintos aspectos de cumplimiento para el bienestar animal y el enriquecimiento del ambiente.

Se ha considerado que el uso del enriquecimiento ambiental en animales en cautiverio permite expresar la totalidad o la mayor parte del comportamiento específico de cada especie, lo cual posibilita a los individuos permanecer y desarrollar sus vidas en un estado de bienestar lo cual impacta en su salud y en consecuencia en la obtención de resultados válidos y confiables cuando estos se usan en investigaciones biomédicas (Baumans 2000, Dean 1999, Newberry 1995).

Existen un gran número de estudios que se realizan con animales de laboratorio, de granja y de zoológicos en donde ha quedado en clara evidencia el beneficio del uso del enriquecimiento ambiental (Prior y col 1994, Van de Weerd y col. 1998, Wurbel y col. 1998). Sin embargo, en el caso de los animales de experimentación se han presentado objeciones al respecto. Existe una preocupación respecto del uso del enriquecimiento ambiental ya que podría representar una alteración de las

condiciones estandarizadas de mantenimiento de los animales influenciando negativamente en los resultados de los estudios o pruebas e incrementando la variabilidad de los resultados de las experiencias. (Jensen y col. 1993). En caso de producirse, el aumento en la variabilidad de los resultados (varianza) podría impactar en el incremento del tamaño de la muestra, es decir en el número de animales que se emplean en las pruebas y estudios, contraponiéndose a uno de los conceptos de las denominadas 3Rs, como es la reducción en el número de animales (Gartner 1999, Russel & Burch, 1959).

Por lo expuesto anteriormente, queda planteada una situación en la cual se observan discrepancias entre las opiniones de diversos autores, ya que, por una parte, las recomendaciones sobre la estandarización de las condiciones de alojamiento, condiciones sanitarias y genéticas de los animales de laboratorio se controlan constantemente para asegurar la reproducibilidad de las pruebas y poder comparar los resultados experimentales, y por otra, se procura su bienestar animal. Lo primero tiene como objetivo reducir las posibles fuentes de variabilidad de los animales y de los factores ambientales (Beynen y col. 1993, Van Zutphen y col. 1993) y lo segundo (mejora del bienestar), estaría aumentando la variabilidad de las pruebas. Por lo tanto estas recomendaciones, si bien proponen que se debe asegurar el bienestar animal, aun no se alcanza un acuerdo o consenso acerca de cómo lograr esa mejora en los animales en forma estandarizada y en consecuencia varios autores niegan el efecto beneficioso del enriquecimiento.

Por otra parte, apoyando la posición sobre los beneficios que resultan del empleo de elementos que enriquecen el ambiente de los animales, muchos autores

sostienen que mediante el uso de enriquecimiento ambiental se obtienen resultados confiables y se emplean menor número de animales. De esta manera se podrían cuestionar aquellos resultados obtenidos con animales mantenidos bajo condiciones estandarizadas estrictas y sin el aporte del enriquecimiento ambiental, es decir que los cambios en los resultados podrían llegar a modificar e invalidar datos históricos (Dean, 1999).

Las propuestas que niegan el beneficio del enriquecimiento ambiental afirman que este es la causa de que los animales generen mayor variabilidad en las respuestas a los procedimientos experimentales a los que se los somete, debido a que muestran un comportamiento más diverso. Mientras que las que se pronuncian a favor, sostienen que los animales que cuentan con enriquecimiento pueden desarrollar todo su repertorio de comportamiento específico, y están más capacitados para hacer frente a los cambios, por estar acostumbrados a vivir en medios enriquecidos. También consideran que son menos excitables o hiper reactivos frente a los nuevos estímulos y muestran una respuesta más uniforme (Baumans 1997, Chamove 1989, Rose 1994, Van de Weerd 1994, Wemelsfelder 1990).

Según esto último se podría proveer animales a los laboratorios criados con la mejor condición física y social y con condiciones ambientales ideales para su bienestar. Asimismo se necesitan menos animales en investigación o en pruebas de rutina y los resultados son seguros y confiables. En estas circunstancias óptimas la variación se reduce notablemente (Chance 1997). Esta no es una nueva observación; en los años 50 (Chance 1956 & 1957), se demostró que el tamaño de la

varianza se relaciona con la naturaleza de las condiciones de alojamiento, tratamiento y situación social en la cual se mantienen los animales de laboratorio.

Muchos investigadores, (por ejemplo, Van de Weerd 1996), sostienen que el enriquecimiento influye no solo en los promedios de un grupo de parámetros biológicos mensurables sino también en la variabilidad de los resultados. Si estas expectativas son válidas a lo largo de un amplio rango de experimentos, eventualmente el uso de animales enriquecidos puede llevar a una reducción en el número de individuos necesarios para obtener resultados experimentales válidos. No obstante, hay pocos estudios que se han llevado a cabo específicamente sobre la variabilidad de los resultados comparando el uso de animales con y sin enriquecimiento.

1-10INTRODUCCIÓN A LA PROBLEMÁTICA PLANTEADA

En la mayoría de los bioterios donde se mantienen a los animales de experimentación los ambientes han sido diseñados para conveniencia de las personas teniendo poca o ninguna consideración sobre las necesidades comportamentales de los animales. Esta forma de mantenimiento estándar o sin enriquecimiento es la que ha venido prevaleciendo desde mediados de los años 50.

La estandarización es y ha sido uno de los conceptos más importantes en la ciencia de los animales de laboratorio. La estandarización de los animales o del medioambiente de los animales (cajas, iluminación, temperatura y calidad del aire) ha contribuido a la mejora de la reproducibilidad de los resultados experimentales.

El fondo genético del animal empleado en experimentos también ha sido estandarizado por sistemas rígidos, por ejemplo, de endocría; los cuales resultaron en cepas con mínima variación genética.

De esta misma manera la estandarización microbiológica resultó en la obtención de animales libres de patógenos específicos (SPF).

Los procedimientos experimentales que se practican en los animales son también estandarizados por el hecho de que muchas veces se siguen reglas estrictas y regulaciones como por ejemplo de las buenas prácticas de laboratorio (BPL).

Los sistemas de alojamiento comúnmente utilizados se han desarrollado principalmente sobre la base de factores económicos y ergonómicos, proveyendo y permitiendo los requerimientos básicos nutricionales de los animales, buenos índices de reproducción, de buena salud y sanitización.

Los estándares de manejo han sido desarrollados fundamentalmente para reducir las variables experimentales, asegurar la reproducibilidad de los resultados experimentales y alcanzar la conveniencia de los investigadores y los técnicos que manejan los animales (Bean 1995). La metodología tradicional de alojamiento de animales de experimentación permite la ejecución fácil de la limpieza y maximiza la utilización dentro del espacio total del bioterio (Ward & DeMille 1991).

Los ambientes estándares para animales de laboratorio sólo cooperan parcialmente con otras necesidades como es el desarrollo de sus comportamientos naturales o las interacciones sociales. Se ha reconocido que los animales tienen necesidades psicológicas, como lo define Poole (1998) “un animal debe ser capaz

de adquirir experiencia lo cual le permite coleccionar y analizar información, para construir una imagen cognitiva del mundo en cual vive y actuar sobre su conocimiento”. El confinamiento de animales en ambientes simplificados con carencias de estímulos puede resultar en animales que experimentan diestrés lo cual puede llevar a que desarrollen comportamientos anormales tales como estereotipias o pasividad (Wemelsfelder 1990, Jensen & Toates 1993).

Cuando muchos signos indican que las condiciones de alojamiento realmente afectan el bienestar de los animales de forma negativa, la pregunta que surge es qué clase de modelos animales se están usando para los experimentos científicos y que impacto tiene esto sobre los resultados y conclusiones (Benn 1995).

Es en esta última década donde la forma de alojamiento de los animales se ha convertido en un tópicoo de discusión. Esto ha impactado en varios cuerpos legislativos y guías internacionales de recomendaciones acerca del cuidado para con los animales de laboratorio. A manera de ejemplo, podemos citar la “Guía para el cuidado y uso los animales de laboratorio 2011, (8ht Edition National Research Council),y la Directiva del Consejo Europeo para la protección de los animales utilizados en experimentación 86/609/CEE, las cuales marcan un cambio gradual desde el tratamiento del animal como un mero objeto de investigación hacia una aproximación en la cual se pone más énfasis en su bienestar como organismo biológico con capacidades especie específicas y sus limitaciones.

El bienestar de los animales cautivos no sólo depende de la ausencia de temor y diestrés o de anomalías comportamentales, sino que también debe imponer la menor restricción a las necesidades fisiológicas y etológicas de los animales (Benn

1995, Markowitz & Line 1990). Esto requiere de medioambientes que permitan atender tales necesidades lo más posibles. Para ello las condiciones estándares de alojamiento necesitan de alguna forma de enriquecimiento del ambiente.

El enriquecimiento ambiental en roedores, hace posible que un animal pueda interactuar con el medio ambiente y mejorar el bienestar cuando está en cautiverio (Beaver 1989). Debe permitir alterar el comportamiento dentro de ciertos parámetros (Chamove 1989).

Existe gran cantidad de literatura acerca de las formas de enriquecimiento ambiental en animales cautivos, por ejemplo empleando elementos como juguetes o subdividiendo parcialmente su habitáculo o microambiente (Bayne 1996, Scharmann 1994). Para evaluar el impacto de un medioambiente modificado en un animal, se debe determinar la latencia, la frecuencia y la duración de los cambios de comportamiento en el mismo (Rose 1994). Por lo tanto, para medir los cambios producidos por el enriquecimiento se pueden realizar diferentes ensayos o test de comportamientos además de evaluar las variables fisiológicas (Manosevitz 1970, Markowitz 1990).

Si bien hay estudios realizados en ratones, la información aportada por los mismos no es lo suficientemente concreta y contundente como para llegar a conclusiones definitivas.

Por otra parte existe una gran controversia debido a que algunos autores critican la opción de brindar enriquecimiento ambiental en animales de experimentación

por el hecho que dificulta y encarece el mantenimiento de los mismos y aumenta la variabilidad de los resultados (varianza) (Eskola y col. 1999, Fernandez y col. 2002).

Por lo expuesto anteriormente he considerado importante analizar las varianzas (como forma de medir la variabilidad) que resulten de criar ratones de experimentación en ambientes con y sin enriquecimiento.

Los resultados de este trabajo podrían contribuir con la definición de si es positiva esta forma de enriquecimiento ambiental o no.

2. HIPÓTESIS

2.1 HIPOTESIS DE TRABAJO: Ho

La variabilidad obtenida en ensayos de campo abierto, con ratones producidos y mantenidos con enriquecimiento ambiental es menor o igual a la obtenida al emplear ratones de experimentación producidos y mantenidos sin enriquecimiento ambiental.

Si esta variabilidad en parámetros comportamentales y fisiológicos es similar o menor a la observada en animales que no tienen enriquecimiento, permitirá generar nuevos protocolos para el manejo de animales en producción o bajo experiencia en los bioterios.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este estudio es analizar la variabilidad que resultará de criar y mantener una cepa endocriada y un stock exocriado de ratones de experimentación con y sin enriquecimiento ambiental.

3.2 OBJETIVOS PARCIALES

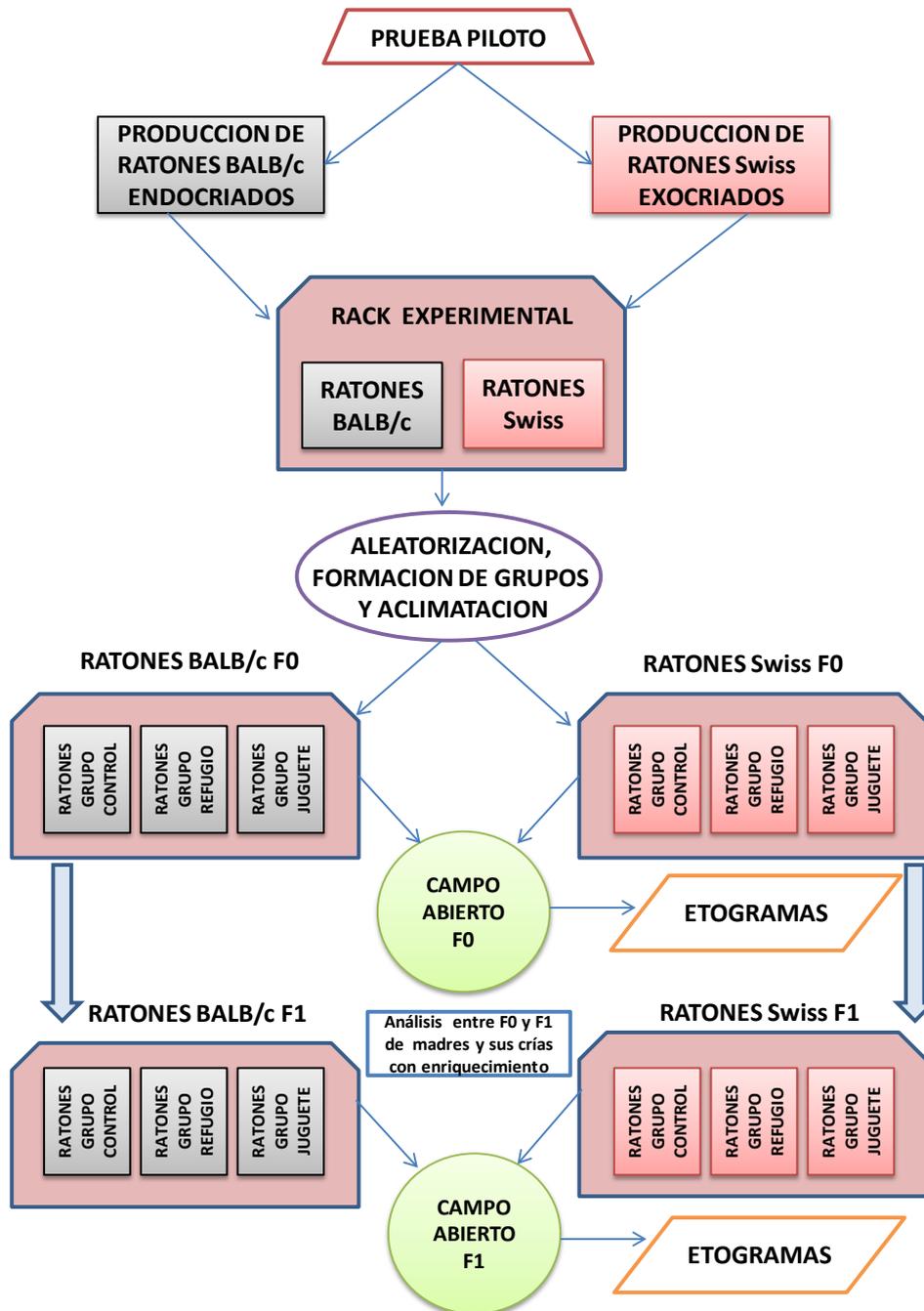
- Analizar el comportamiento de los animales producidos de manera estándar y con enriquecimiento ambiental respectivamente luego de someterlos a un ensayo de campo abierto.
- Estudiar la variabilidad diferencial obtenida de los parámetros conductuales y fisiológicos, en animales que han sido criados con dos tipos diferentes de enriquecimiento ambiental luego de haberlos sometido a un ensayo de campo abierto.
- Analizar el comportamiento de las madres que han sido criadas con enriquecimiento para con sus crías. Esto permitiría determinar la importancia del ambiente enriquecido en las madres y su efecto en las crías, contra el efecto del enriquecimiento sólo en las crías.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 AUTORIZACIÓN PARA REALIZACIÓN DEL PROYECTO: Este trabajo ha sido evaluado por el Comité Institucional para Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de la FCV – UNLP con el número 02-09-10T y ha sido aprobado para su ejecución según memorando 32/12 de la Secretaria de Posgrado de la FCV UNLP.

4.2 FLUJOGRAMA DE LAS ACTIVIDADES

FIGURA 2- Flujoograma de las actividades



4.3 ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Se utilizaron 144 ratones en total (72 ratones de la cepa BALB/c y 72 del stock N:NIH(S)-*Fox1*^{+/+}(Swiss)). Se emplearon 36 animales de la cepa BALB/c y 36 del stock Swisspor generación F0 y F1 respectivamente, 12 machos y 24 hembras de cada cepa, todos de 7 semanas de edad y libres de patógenos específicos. Se escogió esta edad debido a que los ratones terminan la pubertad a las 7 semanas que es cuando comienzan la adultez.

Se eligió la cepa BALB/c (endocriada) por ser una de las difundidas en cuanto a su uso en nuestro país. La misma fue creada por Bagg, cuyos orígenes datan de 1923, y se incorporó al bioterio del LAE FCV UNLP en el año 1993, y se mantiene endogámicamente desde su ingreso bajo los sistemas de auto perpetuación, controlando genéticamente la pureza de la línea desde entonces. Hasta el año 2009 se la mantuvo sin otorgarle ningún tipo de enriquecimiento ambiental. A partir del año 2010 con el objetivo de mejorar la eficiencia de la producción, se iniciaron estudios sobre el uso de materiales para nido poniéndose en marcha ensayos de preferencia en hembras en producción de esta cepa (Maschi y col.2012). Sin embargo, hasta ese momento en nuestro país, se contaba con poca información sobre el comportamiento de los ratones de laboratorio y su relación con el enriquecimiento del ambiente. Su amplia aceptación como animal experimental se debe a que es utilizada como modelo multipropósito, desarrolla hibridomas, es adecuada para la producción de anticuerpos monoclonales, y además presenta características clave como su susceptibilidad a desarrollar desmielinización por infección con virus Theiler

o de la encefalomiелitis murina, es susceptible a *Listeria*, a todas las especies de *Leishmaniaya* algunos *Trypanosoma*.

La elección del stock (exogámico) N:NIH(S)-*Fox1*^{+/+} (de aquí en más Swiss) se debió también a su amplio uso por parte de la comunidad científica. Sus orígenes se remontan al año 1920, fue creada por Clara Lynch quien los introduce desde Lausanne, Suiza al NIH EEUU. Al bioterio del LAE FCV UNLP se incorporó en el año 1998 desde el Instituto Nacional de Salud de USA, y se mantiene exocriada desde su arribo siguiendo un sistema rotacional de manejo de poblaciones exogámicas HAN. Hasta el año 2009 se la mantuvo sin enriquecimiento ambiental al igual que la cepa anterior, y en el 2010 se empieza a trabajar de similar manera que con los BALB/c. La gran aceptación de este stock de ratones se debe a que es ampliamente utilizado para muchos propósitos y donde la variabilidad genética de cada individuo juega un papel fundamental. Da cuenta de ello su uso en pruebas de control de calidad de vacunas y diversos productos; y ensayos toxicológicos.

Todos los animales fueron alojados en las salas de producción SPF del bioterio de la FCV - UNLP. Se mantuvieron con las siguientes condiciones de alojamiento: rack ventilado de la firma Lab Products modelo One Cage, alojados en cajas de polisulfona de 18 x 29 x 13 cm con tapa filtro y ventilación individual en cada caja, con aire filtrado a través de filtros absolutos HEPA, a una temperatura ambiente de 22 +/- 2 °C, 30 – 70 % de humedad relativa, y un fotoperiodo de 10 hs oscuridad y 14 hs luz. Todos los insumos se esterilizaron en autoclave de vapor: lecho de viruta de madera de álamo de 1 x 1 x 0,5 mm, agua de bebida en mamaderas y alimento

extrusado rata – ratón marca Cooperación *ad libitum*. Las cajas se cambiaron una vez por semana.

FIGURA3 – Rack ventilado



4.4ELEMENTOS DE ENRIQUECIMIENTO

El material empleado para el enriquecimiento que se utilizó consistió en:

- Enriquecimiento ambiental tipo A (juguete): poliedro de madera de tamaño similar a un ratón adulto (3 x 3 x 4 cm).

- Enriquecimiento ambiental tipo B (refugio): maple de cartón de tipo comercial (huevera) colocado a modo de refugio con una abertura central.

FIGURA 4 - Caja con enriquecimiento ambiental juguete



FIGURA5 - Caja con enriquecimiento ambiental refugio



Ambos tipos de materiales (refugio y juguete) fueron esterilizados en autoclave de vapor a 121°C durante 25 minutos de esterilizado y 40 de secado.

4.5 CAMPO ABIERTO

Este es un tipo de ensayo para evaluar comportamiento en los animales. Es un campo circular de 70 cm de diámetro limitado por un borde vertical de metal de 25 cm de altura. Esta estructura se apoya sobre un piso de formica blanca con un centro marcado en negro para contraste de las cepas usadas.

FIGURA6 - Campo abierto



Procedimiento:

Cada ratón se transfirió al centro del CA y se comenzó la observación. La duración del tiempo del ensayo se determinó en base a un estudio piloto de

comportamientos y los tiempos en que los ejecutaban. Entre cada ensayo el piso se limpió con papel tissue y alcohol para eliminar olores preexistentes. El ensayo fue grabado con cámara de video y se analizó latencia, duración y frecuencia de ingreso a las distintas zonas definidas - central (diámetro de 20 cm) y periférica (resto del área junto con los bordes).

En todos los animales sometidos a este ensayo se evaluaron mediante un etograma, las siguientes pautas observadas: acicalamiento, desplazamiento y exploración (distintos comportamientos).

Para poner a punto el ensayo, evaluar tiempos de ejecución del procedimiento y observar pautas conductuales se realizaron un total de siete ensayos preliminares con cada cepa BALB/c y Swiss siguiendo el procedimiento anteriormente mencionado. De acuerdo a los resultados obtenidos se resolvió realizar el ensayo de campo abierto en fase diurna y durante 10 minutos de exposición dado que los animales desarrollan un repertorio diverso de pautas comportamentales, cuantificándose los datos solamente por ocurrencia de episodios.

A las 7 semanas de edad se aparearon cada cepa en forma poligámica (1 macho y 2 hembras) los tres grupos experimentales (grupo refugio, grupo juguete y grupo control), formados por 12 animales cada uno. En el momento del apareo, se procedió a enriquecer su ambiente según el siguiente detalle:

Grupo desafío 1: con enriquecimiento ambiental tipo A (juguete): rectángulo de madera de tamaño similar a un ratón adulto.

Grupo desafío 2: con enriquecimiento ambiental tipo B (refugio): maple de cartón (huevera) colocado a modo de refugio con una abertura central.

Grupo control 3: sin enriquecimiento ambiental (condiciones de alojamiento estándar).

FIGURA 7 – caja control sin enriquecimiento



Entre las 9 y 10 semanas de edad se colocó el total de animales de cada grupo en un ensayo de campo abierto para observación del etograma y posteriormente se recogió una muestra de sangre de cada ratón y de cada grupo para evaluar metabolitos de estrés. Dicha muestra se obtuvo por punción de la vena maxilar, procedimiento aceptado, de mínima invasión y que aprovecha la mínima manipulación del animal antes de colocarlo en su jaula nuevamente, la cual se procesó y congeló hasta su análisis por Elisa.

4.6 DESCRIPCIÓN DE LAS PAUTAS COMPORTAMENTALES EN EL CAMPO ABIERTO

- Acicalamiento: en general sentado, el ratón lame su pelaje, se frota con sus patas anteriores o se rasca con cualquier miembro. Frecuentemente el ratón mezcla todas estas formas de acicalarse. El acicalamiento puede ser:
 - a- Acicalamiento elíptico: movimientos asimétricos elípticos de las patas delanteras sobre la nariz y la boca.
 - b- Frotamiento unilateral: frota alternadamente con sus miembros anteriores las vibrisas y el ojo.
 - c- Frotamiento bilateral: brazadas largas, simétricas y bilaterales de sus miembros anteriores que comienzan detrás de las orejas y pasan sobre toda la cara.
 - d- Lamido del cuerpo: lamerse todo el cuerpo, en general empieza en el rostro, cuello y sigue hasta la cola.
- Orinar: el animal recorre por el centro o borde del CA, detiene su marcha y realiza micción. También puede darse cuando recién se coloca el animal en el centro del CA y antes de emprender su recorrido.
- Defecar: el animal recorre por el centro o el borde del CA, detiene su marcha, arquea levemente la base de la cola hacia arriba y realiza deposición. También puede darse cuando recién se coloca el animal en el centro del CA y antes de emprender su recorrido.

- Freezing: cese total de movimientos de manera abrupta.
- Desplazamiento por borde: el animal recorre todo el perímetro del CA.

Generalmente ese recorrido se divide en:

V-V: vaivén. El animal realiza este movimiento de ir hacia un lado y volver en sentido opuesto. Pudiendo registrarse movimientos de vaivén largos (casi media circunferencia del CA) o más cortos.

O-O: vuelta completa.

- Desplazamiento por el centro: el animal recorre olfateando activamente cruzando por el centro hasta llegar al extremo opuesto.
- Exploración con olfateo: el animal olfatea activamente el ambiente. Se da en 2 circunstancias:

Observa estirado detenido: El ratón lleva sus miembros anteriores hacia adelante en contacto con el sustrato y levanta la cabeza hacia arriba y adelante para dirigir sus ojos, orejas y vibrisas hacia adelante. Puede ocurrir cuando se coloca el animal en el centro del CA y antes de iniciar su desplazamiento hacia el borde. También se observa cuando recorre el borde y se detiene tomando esta postura dirigiendo su atención hacia el centro del CA.

Olfateo exploratorio en movimiento: el animal recorre e investiga olfateando activamente por diferentes lugares del CA, con detenciones esporádicas en lugares donde defecó u orinó.

- Exploración sobre miembros posteriores: El ratón pone su peso sobre su tren posterior, eleva sus miembros delanteros del suelo y extiende su cabeza hacia arriba. Puede utilizar la pared como punto de apoyo de sus miembros anteriores o no.
- Recuperación de crías: El ratón recupera y reúne a todas sus crías en un mismo lugar de la caja.

4.7 COMPORTAMIENTO DE MADRES CON ENRIQUECIMIENTO Y SUS CRÍAS:

Para analizar y comparar las conductas de las madres para con sus crías provenientes de grupos enriquecidos y las de los grupos control, se realizó un etograma de la generación F1, tanto para ratones BALB/c como para Swiss, donde se registraron mediante observación directa de cada caja de alojamiento, las siguientes pautas comportamentales:

TABLA 5–Etograma – madres con crías

CONDUCTAS	GRUPO 1: juguete CAJA N°:			GRUPO 2 : refugio CAJA N°:			GRUPO 3: control CAJA N°:		
	♂	♀	♀*	♂	♀	♀*	♂	♀	♀*
ACICALAMIENTO									
RECUPERACION DE CRIAS									

Este procedimiento se realizó luego de efectuado el cambio de caja y de un total de 12 cajas, 6 para los ratones BALB/c y 6 para los Swiss (2 cajas control, 2 refugio y 2 juguete, para cada uno de los grupos respectivamente). Se registró en cada uno de los casos, frecuencias de acicalamiento y recuperación de crías.

4.8 EXTRACCION DE SANGRE

Entre las 9 y 10 semanas de edad se tomó, del total de animales de cada grupo sometidos al ensayo de campo abierto, una muestra de sangre para evaluar metabolitos de estrés. Dicha muestra se obtuvo por punción de la vena maxilar, procedimiento aceptado, de mínima invasión (Morton D. y col. 1993) y que aprovecha la mínima manipulación del animal antes de colocarlo en su jaula nuevamente, la cual se procesó y frezó hasta su análisis por Elisa.

4.9 OBTENCION DE SUERO

Luego de obtención de la muestra de sangre de cada ratón, se colocó en tubos del tipo Eppendorf de 200 μ l. Se dejó reposar hasta que coagulara la sangre obtenida, y posteriormente se centrifugó en un equipo marca KUBOTA 1300 a 8000 RPM y 4°C durante 1 minuto para separar el suero. Se rotulo cada tubo y se guardó en freezer a - 15 °C hasta su procesamiento.

4.10 TECNICA DE TITULACION DE HORMONA

Para la medición de los niveles séricos de Corticosterona se utilizó un kit comercial (AbCam), que consiste en un ELISA competitivo. Se lo empleó siguiendo las instrucciones del fabricante. El ensayo consiste en mezclar 25 μ l de las muestras de suero diluidas o de los estándares de corticosterona (289, 72, 18, 4.5, 0.8, 0 nmol/l) con 25 μ l del conjugado (corticosterona biotinilada) en los pocillos sensibilizados con anticuerpos anti-corticosterona. La placa se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente y luego de los lavados correspondientes se agregó 50 μ l de streptavidina conjugada a peroxidasa (HRP) y se incubó por 30 minutos. Luego de los lavados, se

agregó 50 μ l del sustrato/cromógeno (TMB), y se detuvo la reacción mediante el agregado de ácido sulfúrico 2N. Se leyó la densidad óptica (DO) a 450 nm en lector de microplacas de ELISA (Sirio SAECS, Radim Company, Italia). A partir de los valores de DO de los estándares, se construyó una curva de calibración DO 450 nm vs concentración de corticosterona (nmol/l), que permitió calcular la concentración de corticosterona en las muestras problema mediante la aplicación de la función matemática logit (p).

4.11ANALISIS ESTADISTICO

Ho ACEPTADA: los ratones con enriquecimientos ambientales tiene una variabilidad (varianza) menor o igual a los ratones control.

Ho RECHAZADA: los ratones con enriquecimiento ambiental tienen una variabilidad (varianza) mayor a la de los ratones control.

Se realizará un análisis separado por cada cepa/línea de ratones.

Análisis de la varianza:

Se realiza el análisis de la varianza (ANOVA) mediante el programa Statgraphics Centurion XVI para cada grupo experimental, entre animales controles y con enriquecimientos, para cada generación F0 y F1 y para cada una de las pautas comportamentales y los datos de corticosterona.

En los casos en que la distribución de los datos no se comportó de manera normal se procedió a realizar el análisis de Kruskal-Wallis.

Con el fin de analizar la amplitud de las variaciones observadas en las diferentes conductas estudiadas se estimó F (Fisher) como cociente entre la varianza mayor y menor observadas en la población.

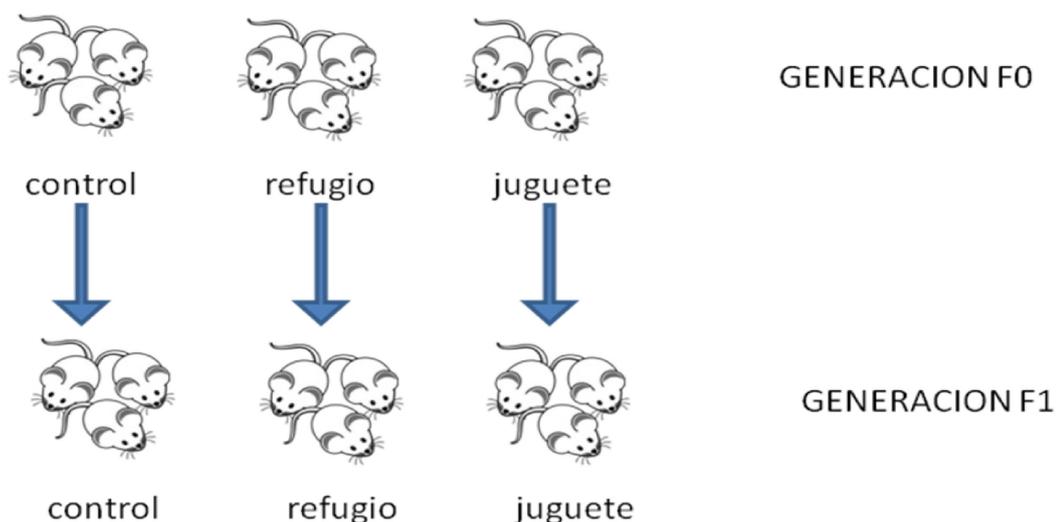
$$F = \sigma^2_{\text{mayor}} / \sigma^2_{\text{menor}}$$

$P < 0,05$

5. RESULTADOS:

Para el primer objetivo de este estudio que fue analizar la variabilidad de parámetros comportamentales que resultaron de criar y mantener una cepa y un stock de ratones de experimentación (BALB/c y Swiss) con y sin enriquecimiento ambiental, en una primer instancia se sometió a la cepa de ratones BALB/c, que nunca había convivido con enriquecimiento ambiental, al desafío de 2 tipos de enriquecimiento: refugio y juguete, y se los comparó con un grupo control (generación F0). Luego de evaluar su comportamiento y sus parámetros fisiológicos en el campo abierto (CA), a cada grupo se los apareó para que se reproduzcan y esta descendencia (generación F1) se volvió a aparear con el mismo tipo de enriquecimiento de los padres, conformando los otros 3 grupos (control, refugio y juguete) de la F1 (fig.47).

FIGURA 8 – grupos experimentales BALB/c F0 y F1



5.1 RESULTADOS DE LAS PAUTAS COMPORTAMENTALES -CEPA BALB/c

El conjunto de conductas seleccionadas para el estudio en el campo abierto de la cepa BALB/c, se dividió en conductas activas y pasivas, siendo las primeras aquellas en las que interviene la locomoción y las pasivas en las cuales no interviene.

Las conductas pasivas que se estudiaron fueron: acicalamiento, freezing, defecar y orinar; y las activas: exploración y olfateo, exploración sobre los dos miembros posteriores, desplazamiento atravesando el centro del campo abierto, desplazamiento por el borde del campo abierto en vaivén y por el borde del campo abierto completando el recorrido en un círculo completo.

Referencias: NS: no significativo – SIG: significativo

TABLA 6 - Conducta acicalamiento, Cepa BALB/c, resumen estadístico de grupos

ratones BALB/c - F0 Acicalamiento	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
Promedio	1,666	1,25	2,666
DS	1,073	0,754	1,303
Varianza	1,151	0,568	1,697
ratones BALB/c - F1 Acicalamiento	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
promedio	1,833	1,583	1,333
DS	1,029	0,792	0,651
Varianza	1,06	0,628	0,424

TABLA 7 - Conducta acicalamiento, Cepa BALB/c, comparación entre grupos

ACICALAMIENTO			
Cepa	Control vs Refugio	Control vs Juguete	Refugio vs Juguete
BALB/c F0	NS	NS	SIG
BALB/c F1	NS	NS	NS

Para la conducta de acicalamiento solo hubo diferencias significativas entre los enriquecimientos refugio y juguete en el caso de la cepa BALB/c en la F0. Siendo más alta la varianza en el grupo juguete.

BALB/c F0: Aquí el valor $F = 2,68$ para un probabilidad de $p < 0,05$ y el valor obtenido de la razón de $\sigma^2 = 2,9869$ por lo que se rechazaría la H_0 , hay diferencias significativas entre los diferentes enriquecimientos.

FIGURA 9- ANOVA Simple - acicalamiento - cepa BALB/c F0

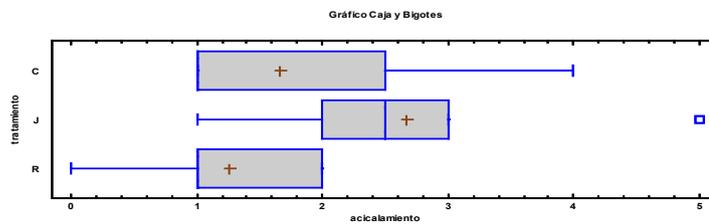


FIGURA 10 - ANOVA Simple - acicalamiento - cepa BALB/c F1

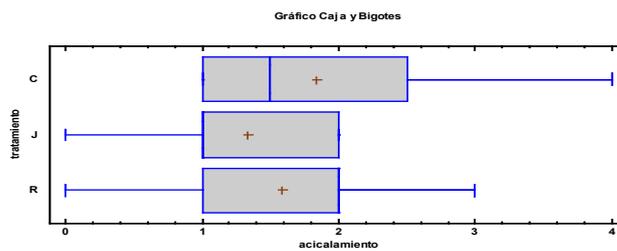


TABLA 8 - Conducta orinar, Cepa BALB/c, resumen estadístico de grupos

ratones BALB/c - F0 Orinar	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
promedio	0,583	0,583	0,5
DS	0,668	0,515	0,522
Varianza	0,447	0,265	0,273
ratones BALB/c - F1 Orinar	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
promedio	0,75	0,416	0,583
DS	0,452	0,515	0,515
Varianza	0,204	0,265	0,265

TABLA9 - Conducta orinar, Cepa BALB/c, comparación entre grupos

ORINAR			
Cepa	Control vs refugio	Control vs Juguete	Refugio vs Juguete
BALB/c F0	NS	NS	NS
BALB/c F1	NS	NS	NS

Para la conducta orinar no hubo diferencias significativas entre ambos tipos de enriquecimiento.

FIGURA 11–Kruskal – Wallis – orinar - cepa BALB/c F0

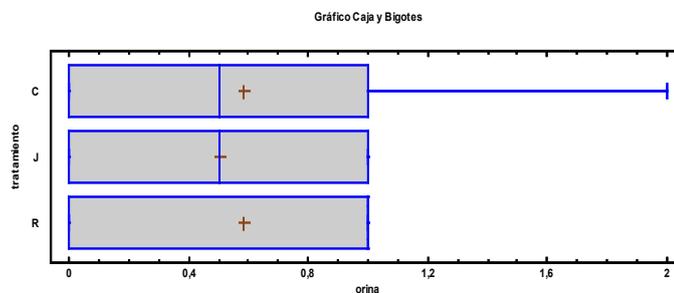


FIGURA 12 -Kruskal – Wallis – orinar - cepa BALB/c F1

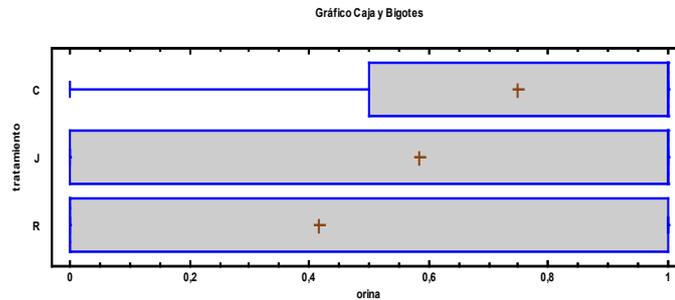


TABLA 10 - Conducta defecar, Cepa BALB/c, resumen estadístico de grupos

ratones BALB/c - F0 Defecar	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
promedio	7,25	7,666	5,666
DS	1,215	1,923	1,775
Varianza	1,477	3,697	3,151
ratones BALB/c - F1 Defecar	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
promedio	8,583	7,833	7,5
DS	3,502	2,657	2,022
Varianza	12,265	7,06	4,0909

TABLA 11 - Conducta defecar, Cepa BALB/c, comparación entre grupos

DEFECAR			
Cepa	Control vs refugio	Control vs Juguete	Refugio vs Juguete
BALB/c F0	NS	NS	NS
BALB/c F1	NS	SIG	NS

Para la conducta defecar solo hubo diferencias significativas entre el grupo control (mayor varianza) y el de enriquecimiento juguete para la cepa BALB/c en la F1.

BALB/c F1: Aquí el valor $F = 2,68$ para la probabilidad $p < 0,05$, y el valor obtenido de la razón de $\sigma^2 = 2,9981$, por lo que se rechazaría la H_0 , hay diferencias significativas entre el grupo con enriquecimiento juguete y el grupo control.

FIGURA 13 - ANOVA Simple – defecar - cepa BALB/c F0

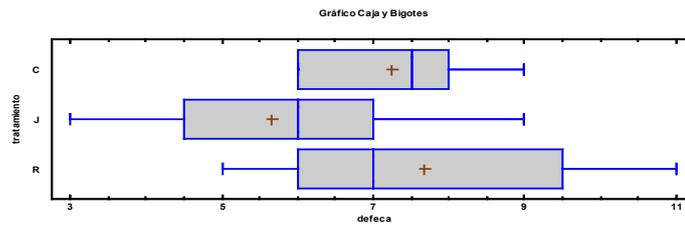


FIGURA 14 - ANOVA Simple – defecar - cepa BALB/c F1

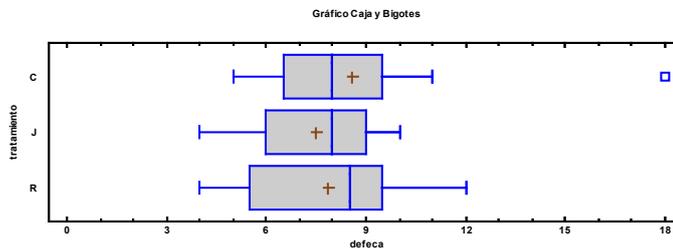


TABLA 12 - Conducta freezing, Cepa BALB/c, resumen estadístico de grupos

ratones BALB/c - F0 Freezing	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
promedio	3,083	6,5	5,083
DS	2,745	3,118	3,872
Varianza	7,537	9,732	14,992
ratones BALB/c - F1 Freezing	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
promedio	1,583	5,5	3,916
DS	2,274	3	3,342
Varianza	5,174	9	11,174

TABLA 13 - Conducta freezing, Cepa BALB/c, comparación entre grupos

FREEZING			
Cepa	Control vs refugio	Control vs juguete	Refugio vs Juguete
BALB/c F0	NS	NS	NS
BALB/c F1	NS	NS	NS

Para la conducta freezing no hubo diferencias significativas entre grupos ni entre generaciones.

FIGURA 15 - ANOVA Simple – Freezing - cepa BALB/cF0

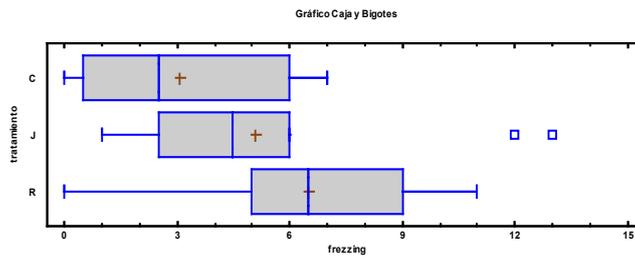


FIGURA16 - Kruskal – Wallis – Freezing - cepa BALB/c F1

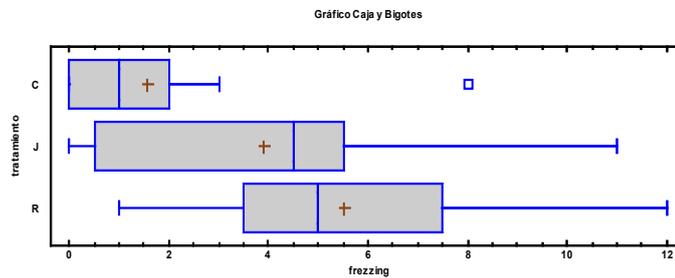


TABLA 14 - Conducta Desplazamiento por el borde (VV), Cepa BALB/c, resumen estadístico de grupos

ratones BALB/c - F0 Desplaz por borde VV	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
promedio	6,167	3,083	3,916
DS	3,762	2,678	3,423
Varianza	14,151	7,174	11,719
ratones BALB/c - F1 Desplaz por borde VV	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
promedio	3	2,916	3,916
DS	1,705	1,164	2,678
Varianza	2,909	1,356	7,174

TABLA 15 - Conducta Desplazamiento por el borde (VV), Cepa BALB/c, comparación entre grupos

DESPLAZAMIENTO POR EL BORDE (VV)			
Cepa	Control vs refugio	Control vs juguete	Refugio vs Juguete
BALB/c F0	NS	NS	NS
BALB/c F1	NS	NS	SIG

Para la conducta desplazamiento por el borde (vaivén) hubo diferencias significativas entre los grupos con enriquecimiento refugio y juguete para la cepa BALB/c en la F1. La varianza fue mayor en el grupo juguete. El valor $F = 2,68$ para $p < 0.05$ y la razón de $\sigma^2 = 5,2907$; se rechazaría la H_0 , hay diferencias significativas entre los grupos con enriquecimientos.

FIGURA17 - ANOVA Simple – desplazamiento por el borde (vaivén) - cepa BALB/c F0

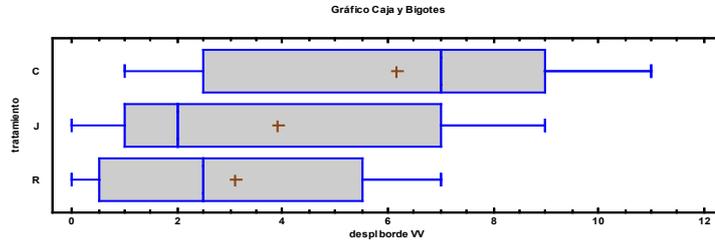


FIGURA 18 - ANOVA Simple – desplazamiento por el borde (vaivén) - cepa BALB/c F1

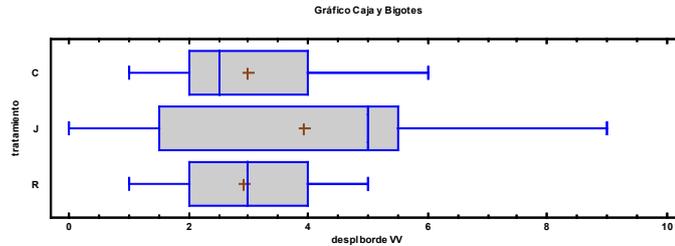


TABLA 16 - Conducta Desplazamiento por el borde (OO), Cepa BALB/c, resumen estadístico de grupos

ratones BALB/c - F0 Desplaz por borde OO	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
promedio	0,416	0,083	0,75
DS	0,668	0,288	1,422
Varianza	0,447	0,083	2,016
ratones BALB/c - F1 Desplaz por borde OO	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
promedio	2,25	0,25	0,833
DS	1,544	0,621	1,337
Varianza	2,386	0,386	1,787

TABLA 17 - Conducta Desplazamiento por el borde (OO), Cepa BALB/c, comparación entre grupos

DESPLAZAMIENTO POR EL BORDE (OO):			
Cepa	Control vs refugio	Control vs juguete	Refugio vs Juguete
BALB/c F0	SIG	SIG	SIG
BALB/c F1	SIG	NS	SIG

Para la conducta desplazamiento por el borde (en círculo completo) hubo diferencias significativas entre los grupos con enriquecimiento y el grupo control. Este último presentó una varianza mayor que el grupo refugio pero menor que el grupo juguete, y entre enriquecimientos, el grupo juguete tuvo mayor varianza que el grupo refugio para la cepa BALB/c en la FO. Para la F1 de la misma cepa hubo diferencias significativas entre grupo control (mayor varianza) y el de enriquecimiento refugio; y también cuando se comparan entre sí grupos con enriquecimientos. Entre estos últimos el grupo juguete tuvo mayor varianza que refugio.

BALB/c F0: Aquí el valor $F= 2,68$ para $p<0.05$ y la razón de $\sigma^2= 5,36$, por lo tanto se rechazaría la H_0 , hay diferencia significativa entre los grupos con enriquecimientos y el grupo control.

BALB/c F1: En este caso $F= 2,68$ para $p<0.05$ y la razón de $\sigma^2= 6,1773$, por lo que se rechazaría la H_0 , hay diferencias significativas entre el grupo control y el grupo refugio.

FIGURA19 - Kruskal – Wallis – desplazamiento por el borde (círculos completos) - cepa BALB/c F0

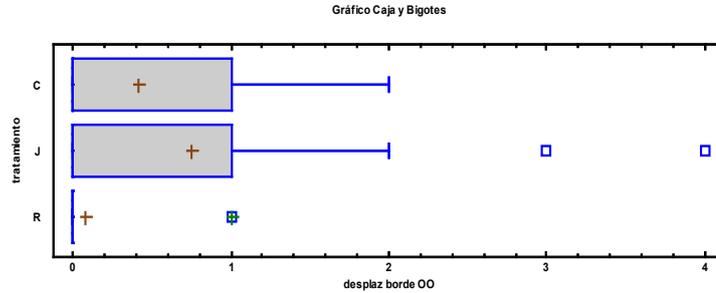


FIGURA20 - Kruskal – Wallis – desplazamiento por el borde (círculos completos) - cepa BALB/c F1

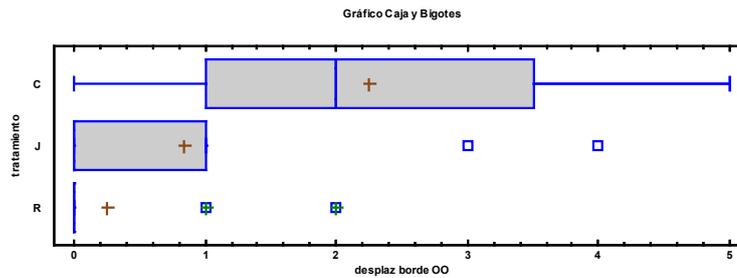


TABLA 18 - Conducta Exploración Olfateo, Cepa BALB/c, resumen estadístico de grupos

ratones BALB/c - F0 Exploración olfateo	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
promedio	8,583	6,666	7
DS	0,996	2,146	1,954
Varianza	0,992	4,606	3,818
ratones BALB/c - F1 Exploración olfateo	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
promedio	6,5	6,083	5,833
DS	1,314	1,676	2,081
Varianza	1,727	2,81	4,333

TABLA 19 - Conducta Exploración Olfateo, Cepa BALB/c, comparación entre grupos

EXPLORACION OLFATEO			
Cepa	Control vs refugio	Control vs juguete	Refugio vs Juguete
BALB/c F0	SIG	SIG	NS
BALB/c F1	NS	NS	NS

Para la conducta exploración olfateo hubo diferencias significativas entre los grupos con enriquecimiento (mayor varianza) y el grupo control para la cepa BALB/c en la FO.

BALB/c F0: El valor de $F = 2,68$ para $p < 0.05$ y la razón de $\sigma^2 = 4,6.4$, hay diferencia significativa entre g. control y refugio, se rechazaría la H_0 .

El valor $F = 2,68$ para $p < 0,05$, y la razón de $\sigma^2: 3,85$. Hay diferencia significativa entre grupo control y juguete.

FIGURA21 - ANOVA Simple – Explora - olfatea - cepa BALB/c F0

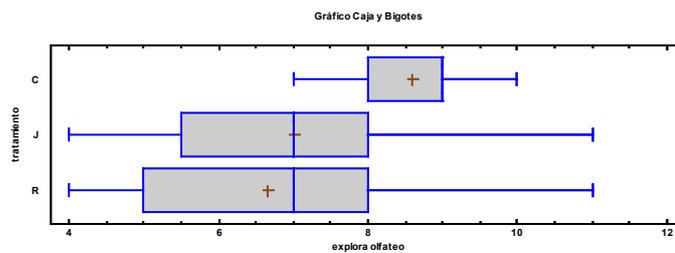


FIGURA 22 - ANOVA Simple – Explora - olfatea - cepa BALB/c F1

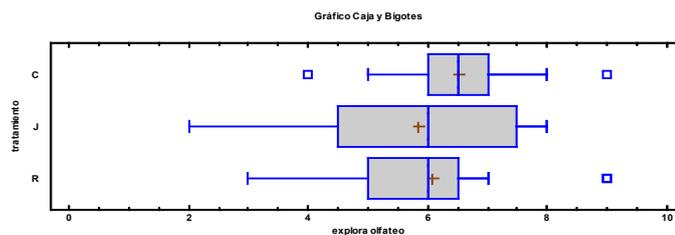


TABLA 20 - Conducta Exploración sobre sus miembros posteriores, Cepa BALB/c, resumen estadístico de grupos

ratones BALB/c - F0 Exploración s/miembros inf.	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
promedio	1	0,25	1,916
DS	1,279	0,452	0,996
Varianza	1,636	0,204	0,992
ratones BALB/c - F1 Exploración s/miembros inf	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
promedio	3,166	0,916	1,416
DS	2,329	0,9	1,729
Varianza	5,424	0,81	2,992

TABLA 21 - Conducta Exploración sobre sus miembros posteriores, Cepa BALB/c, comparación entre grupos

EXPLORACIONES/MIEMBROS POSTERIORES			
Cepa	Control vs refugio	Control vs juguete	Refugio vs Juguete
BALB/c F0	SIG	NS	SIG
BALB/c F1	SIG	NS	SIG

Para la conducta exploración sobre sus miembros posteriores hubo diferencias significativas entre el grupo con enriquecimiento refugio y el grupo control (mayor varianza), y entre grupos con enriquecimientos (juguete con valor mayor de varianza) para la cepa BALB/c en la FO. Esto mismo se repitió para la misma cepa pero en la F1. BALB/c F0: El valor de $F = 2,68$ para $p < 0.05$ y la razón de $\sigma^2 = 8,0014$, se rechazaría la H_0 , hay diferencias significativas entre los diferentes enriquecimientos y su grupo control.

BALB/c F1: Aquí $F= 2,68$ para $p<0.05$, y la razón de $\sigma^2=6,6915$; se rechazaría la H_0 , hay diferencias significativas entre el grupo control y refugio.

FIGURA 23 - Kruskal – Wallis – Exploración sobre sus miembros posteriores - cepa BALB/c F0

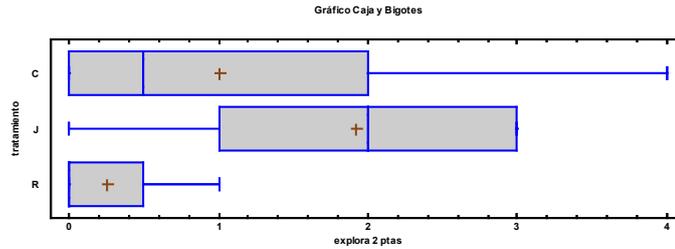


FIGURA 24 - Kruskal – Wallis – Exploración sobre sus miembros posteriores - cepa BALB/c F1

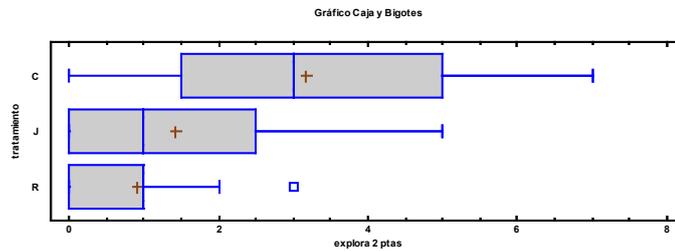


TABLA 22 - Conducta Desplazamiento por el centro, Cepa BALB/c, resumen estadístico de grupos

ratones BALB/c - F0 Desplazamiento por el centro	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
promedio	0,416	0,333	0,75
DS	1,443	1,154	1,764
Varianza	2,083	1,333	3,113
ratones BALB/c - F1 Desplazamiento por el centro	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
promedio	1,75	0	0,416
DS	2,701	0	1,164
Varianza	7,295	0	1,356

TABLA 23 - Conducta Desplazamiento por el centro, Cepa BALB/c, comparación entre grupos

DESPLAZAMIENTO POR EL CENTRO			
Cepa	Control vs refugio	Control vs juguete	Refugio vs Juguete
BALB/c F0	NS	NS	NS
BALB/c F1	NS	SIG	NS

Para la conducta desplazamiento por el centro hubo diferencias significativas entre el grupo con enriquecimiento juguete y el grupo control (con mayor varianza en este), para la cepa BALB/c en la F1.

BALB/c F1: Aquí $F = 2,68$ para $p < 0.05$, y la razón de $\sigma^2 = 5,38$, por lo tanto se rechazaría la H_0 , hay diferencias significativas entre grupo control y juguete.

FIGURA 25 - Kruskal – Wallis – Desplazamiento por el centro - cepa BALB/c F0

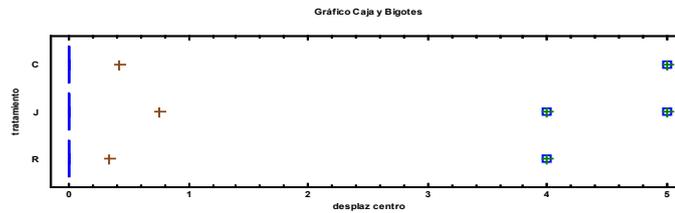
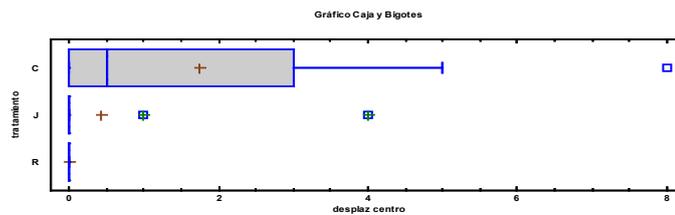


FIGURA 26 - Kruskal – Wallis – Desplazamiento por el centro - cepa BALB/c F1



Agrupación de relaciones de varianzas entre grupos

TABLA 24 - Relaciones de varianza, Cepa BALB/c, comparación entre grupos control y juguete

niveles significativos: REL VARIANZAS CONTROL vs JUGUETE			
CONDUCTAS	Control	Cepa	Juguete
DESPLAZAM. BORDE OO		BALB/c F0	**
DEFECAR	**	BALB/c F1	
EXPLORAR OLFATEO		BALB/c F0	**
DESPLAZAM. CENTRO	**	BALB/c F1	

Al agrupar las relaciones de varianzas entre grupos control versus g. juguete se observa la varianza fue mayor (**) en los grupos control para las conductas descritas en el gráfico anterior para la cepa, en la generación F1y para los BALB/c F0 fue mayor para el grupo con enriquecimiento juguete en las conductas de desplazamiento por los bordes en círculos completos y explorar olfateo.

TABLA 25 - Relaciones de varianza, Cepa BALB/c, comparación entre grupos control y refugio

niveles significativos: REL VARIANZAS CONTROL vs REFUGIO			
CONDUCTAS	control	cepa	refugio
DESPLAZ BORDE OO	**	BALB/c F0	
	**	BALB/c F1	
EXPLORAR OLFATEO		BALB/c F0	**
EXPLORA S/MIEMBROS POSTERIORES	**	BALB/c F0	
	**	BALB/c F1	

Al agrupar las relaciones de varianzas entre los grupos control versus grupos refugio se observa la varianza fue mayor (**) en los grupos control para las conductas descritas en el gráfico anterior y en ambas generaciones excepto para los BALB/c F0 en la conducta explorar olfateo.

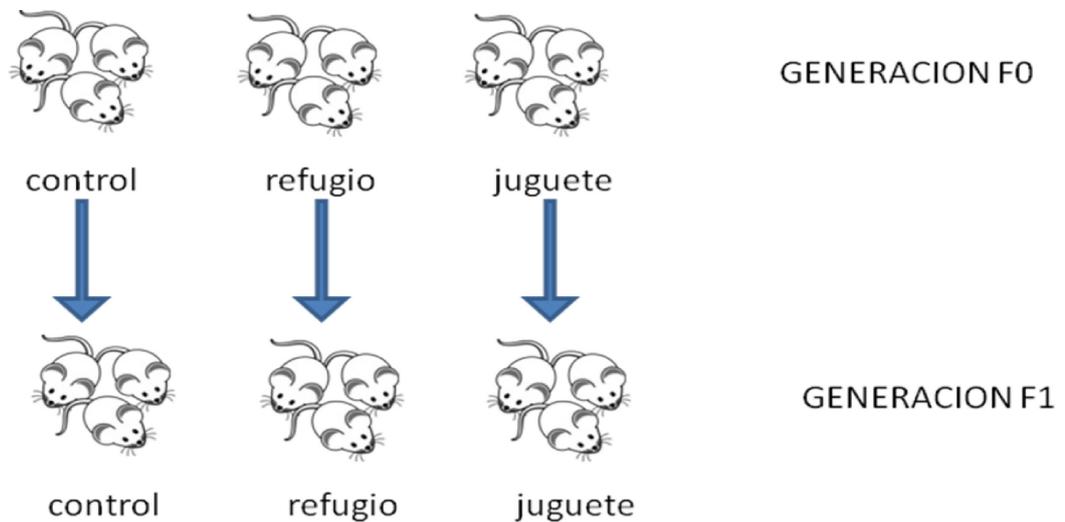
TABLA 26 - Relaciones de varianza, Cepa BALB/c, comparación entre grupos refugio y juguete.

Niveles significativos: REL VARIANZAS REFUGIO vs JUGUETE			
CONDUCTAS	Refugio	cepa	juguete
ACICALAMIENTO		BALB/c F0	**
DESPLAZ BORDE VV		BALB/c F1	**
DESPLAZ BORDE OO		BALB/C F0	**
		BALB/C F1	**
EXPLORA S/MIEMBROS POSTERIORES		BALB/C F0	**
		BALB/C F1	**

Al agrupar las relaciones de varianzas entre los grupos con enriquecimiento refugio versus juguete se observa que la varianza fue mayor (**) para el de enriquecimiento juguete en las conductas descritas en el gráfico anterior y en ambas generaciones.

5.2 RESULTADOS DE LAS PAUTAS COMPORTAMENTALES - STOCK Swiss: El mismo esquema planteado para la cepa BALB/c se repitió con el stock de ratones Swiss, donde también el objetivo fue analizar la variabilidad de parámetros comportamentales y fisiológicos que resultó de criar y mantener este stock con y sin enriquecimiento ambiental. Se sometió a estos ratones que nunca habían recibido enriquecimiento ambiental, al desafío de 2 tipos de enriquecimiento: refugio y juguete y se los comparó con un grupo control (generación F0). A cada grupo se los apareó para que se reproduzcan y se volvió a criar a esta descendencia (generación F1) con el mismo tipo de enriquecimiento de los padres, conformando los 3 grupos (control, refugio y juguete) respectivamente (fig.48).

FIGURA 27– grupos experimentales Swiss F0 y F1



Para el stock de ratones Swiss también al conjunto de conductas seleccionadas para su estudio en el campo abierto se las dividió en activas y pasivas teniendo en cuenta las mismas consideraciones que para la cepa BALB/c.

Las conductas pasivas que se estudiaron fueron: acicalamiento, freezing, defecar y orinar.

Las conductas activas: exploración y olfateo, exploración sobre los dos miembros posteriores, desplazamiento atravesando por el centro del campo abierto, desplazamiento por el borde del campo abierto en vaivén y desplazamiento por el borde del campo abierto completando el recorrido en un círculo completo.

Referencias: NS: no significativo – SIG: significativo

TABLA 27 - Conducta Acicalamiento, Stock Swiss, resumen estadísticos entre grupos

ratones Swiss - F0 Acicalamiento	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
Promedio	1,833	1,583	1,333
DS	1,029	0,792	0,651
Varianza	1,06	0,628	0,424
ratones Swiss - F1 Acicalamiento	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
Promedio	2,16	1,91	2,08
DS	1,114	1,311	0,996
Varianza	1,242	1,719	0,992

TABLA 28 - Conducta Acicalamiento, Stock Swiss, comparación entre grupos

ACICALAMIENTO			
STOCK	Control vs refugio	Control vs juguete	Refugio vs Juguete
Swiss F0	NS	NS	NS
Swiss F1	NS	NS	NS

Para la conducta acicalamiento no hubo diferencias significativas entre grupos controles y con enriquecimientos.

FIGURA 28 - ANOVA Simple – acicalamiento - StockSwiss F0

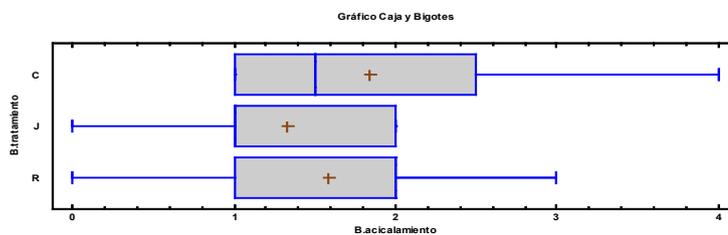


FIGURA 29 - ANOVA Simple – acicalamiento - Stock Swiss F1

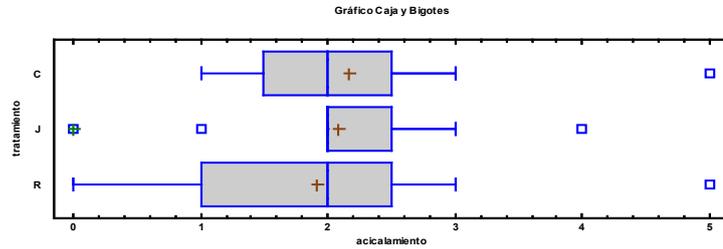


TABLA 29 - Conducta Orinar, Stock Swiss, resumen estadístico entre grupos

ratones Swiss - F0 Orinar	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
Promedio	0	0,0833	0,333
DS	0	0,288	0,492
Varianza	0	0,083	0,242
ratones Swiss - F1 Orinar	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
Promedio	0,25	0,25	0,83
DS	0,452	0,452	0,577
Varianza	0,204	0,204	0,333

TABLA 30 - Conducta Orinar, Stock Swiss, comparación entre grupos

ORINAR			
STOCK	Control vs refugio	Control vs juguete	Refugio vs Juguete
Swiss F0	NS	NS	SIG
Swiss F1	NS	NS	NS

Para la conducta orinar solo hubo diferencias significativas entre ambos grupos con enriquecimiento, donde el grupo juguete tuvo mayor varianza que refugio para el stock Swiss en la FO.

Swiss F=: Aquí $F = 2,68$ para $p < 0,05$, y la razón de $\sigma^2 = 2,9204$; se rechazaría la H_0 , hay diferencias significativas entre enriquecimientos.

FIGURA 30 - Kruskal – Wallis – orinar - Stock Swiss F0

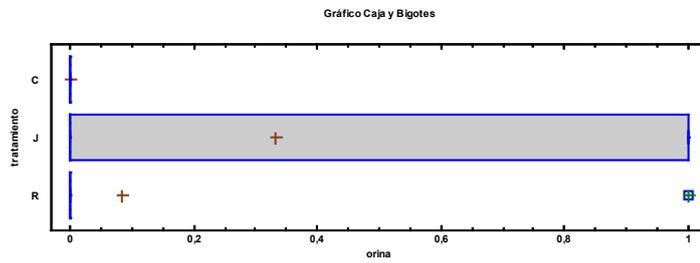


FIGURA 31 - Kruskal – Wallis – orinar - Stock Swiss F1

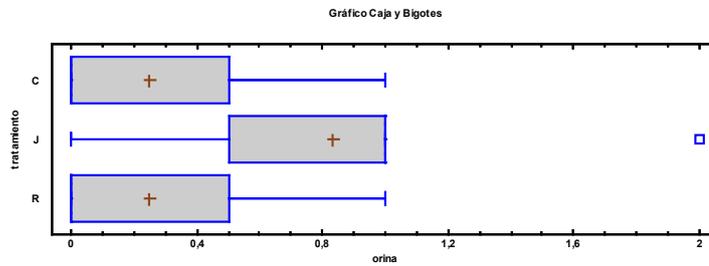


TABLA 31 - Conducta Defecar, StockSwiss, resumen estadístico entre grupos

ratones Swiss - F0 Defecar	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
Promedio	4.91	6,25	5.66
DS	3,287	3,441	2,229
Varianza	10,81	11,84	4,969
ratones Swiss - F1 Defecar	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
Promedio	6,08	5,91	7,83
DS	3,26	2,391	2,367
Varianza	10,628	5,719	5,606

TABLA 32 - Conducta Defecar, StockSwiss, comparación entre grupos

DEFECAR			
STOCK	Control vs refugio	Control vs juguete	Refugio vs Juguete
Swiss F0	NS	NS	NS
Swiss F1	NS	NS	NS

Para la conducta defecar no hubo diferencias significativas entre grupos controles y con enriquecimientos.

FIGURA 32 - ANOVA Simple – defecar - Stock Swiss F0

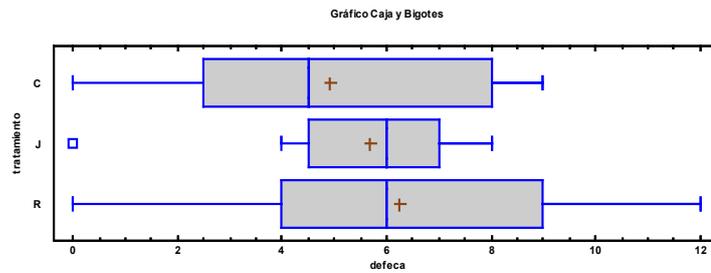


FIGURA33 - ANOVA Simple – defecar - Stock Swiss F1

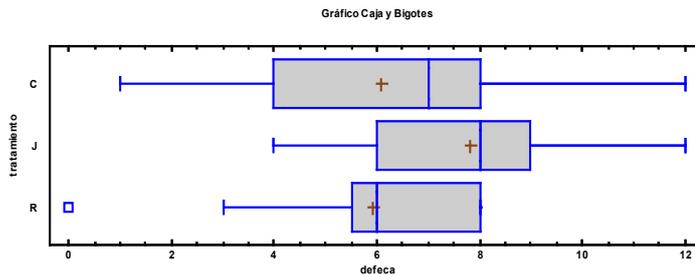


TABLA 33 - Conducta Freezing, Stock Swiss, resumen estadístico entre grupos

ratones Swiss - F0 Freezing	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
promedio	0,166	0,083	0
DS	0,389	0,288	0
Varianza	0,151	0,833	0
ratones Swiss - F1 Freezing	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
promedio	0	0	0
DS	0	0	0
Varianza	0	0	0

TABLA 34 - Conducta Freezing, Stock Swiss, comparación entre grupos

FREEZING			
STOCK	Control vs refugio	Control vs juguete	Refugio vs Juguete
Swiss F0	NS	NS	NS
Swiss F1	NS	NS	NS

Para la conducta freezing no hubo diferencias significativas entre ningún grupo ni generación.

FIGURA 34 - Kruskal – Wallis – Freezing - Stock Swiss F0 y F1

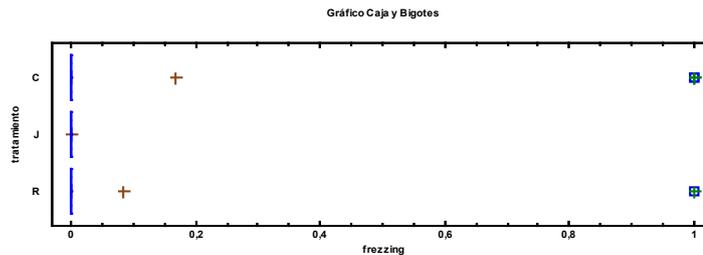


TABLA 35 - Conducta desplazamiento por los bordes (VV), Stock Swiss, resumen estadístico entre grupos

ratones Swiss - F0 Desplazamiento por los bordes (VV)	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
Promedio	3	2,91	3,916
DS	1,705	1,164	2,678
Varianza	2,909	1,356	7,174
ratones Swiss - F1 Desplazamiento por los bordes (VV)	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
Promedio	12,58	11,16	14,66
DS	3,654	3,485	4,792
Varianza	13,356	12,151	22,969

TABLA 36 - Conducta desplazamiento por los bordes (VV), Stock Swiss, comparación entre grupos

DESPLAZAMIENTO POR EL BORDE (VV)			
STOCK	Control vs refugio	Control vs juguete	Refugio vs Juguete
Swiss F0	NS	NS	SIG
Swiss F1	NS	NS	NS

Para la conducta desplazamiento por el borde (vaivén) hubo diferencias significativas entre los grupos con enriquecimiento refugio y juguete para el stock Swiss en la F0. La varianza fue mayor en el grupo juguete. $F= 2,68$ para $p<0.05$, y $\sigma^2=5,2907$; se rechazaría la H_0 , hay diferencias significativas entre los grupos con enriquecimiento.

FIGURA 35 - ANOVA Simple, Desplazamiento por el borde (vaivén), Stock Swiss F0

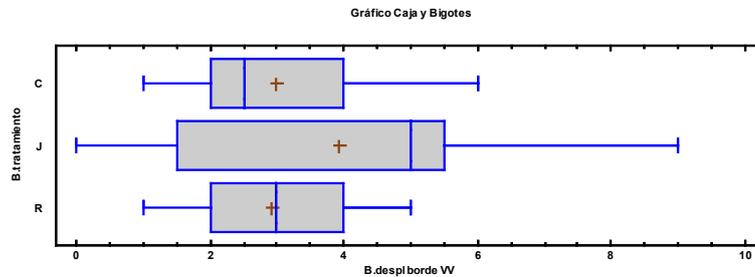


FIGURA 36 - ANOVA Simple, Desplazamiento por el borde (vaivén), Stock Swiss F1

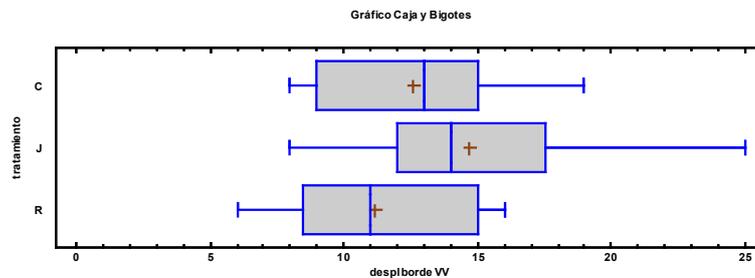


TABLA 37 - Conducta Desplazamiento por el borde (OO),StockSwiss, resumen estadístico entre grupos

ratones Swiss - F0 Desplazamiento por los bordes (OO)	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
Promedio	2,25	0,25	0,833
DS	1,544	0,621	1,337
Varianza	2,386	0,386	1,787
ratones Swiss - F1 Desplazamiento por los bordes (OO)	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
Promedio	8,41	9	6,83
DS	5,071	4,861	2,979
Varianza	25,719	23,636	8,878

TABLA 38 - Conducta Desplazamiento por el borde (OO),StockSwiss, comparación entre grupos

DESPLAZAMIENTO POR EL BORDE (OO)			
STOCK	Control vs refugio	Control vs juguete	Refugio vs Juguete
Swiss F0	SIG	NS	SIG
Swiss F1	NS	NS	NS

Para la conducta desplazamiento por el borde (en círculo completo) hubo diferencias significativas entre los grupos con enriquecimientos y el grupo control. Control presentó una varianza mayor que refugio, y entre enriquecimientos, juguete tuvo mayor varianza que refugio para el stockSwiss FO. Para la F1 de la misma línea no hubo diferencias significativas.

Swiss F0: $F = 2,68$ para $p < 0.05$, $y\sigma^2 = 6,1773$; se rechazaría la H_0 , hay diferencias significativas entre el grupo control y refugio.

FIGURA 37 - Kruskal – Wallis – Desplazamiento por el borde (círculos completos) - Stock Swiss F0

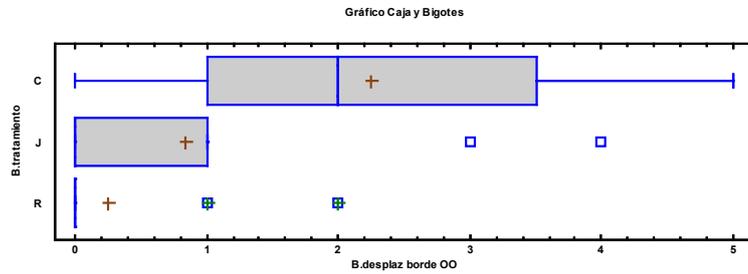


FIGURA38 - ANOVA Simple – Desplazamiento por el borde (círculos completos) - Stock Swiss F1

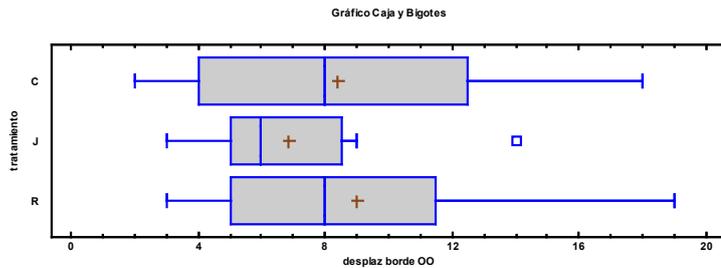


TABLA 39 - Conducta Exploración olfateo,StockSwiss, resumen estadístico entre grupos

ratones Swiss - F0 Exploración Olfateo	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
Promedio	16,91	18,33	16,83
DS	6,345	2,964	4,018
Varianza	40,265	8,787	16,151
ratones Swiss - F1 Exploración Olfateo	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
Promedio	15,66	17,33	16,75
DS	3,22	3,25	3,38
Varianza	10,424	10,606	11,477

TABLA 40 - Conducta Exploración olfateo, StockSwiss, comparación entre grupos

EXPLORACION OLFATEO			
STOCK	Control vs refugio	Control vs juguete	Refugio vs Juguete
Swiss F0	SIG	NS	NS
Swiss F1	NS	NS	NS

Para la F0 de la cepa SWISS hubo diferencias significativas entre el grupo control (varianza más alta) y el de enriquecimiento refugio solamente. Swiss F0: $F=2.68$ para $p<0.05$ y $\sigma^2= 4.5818$, hay diferencia significativa entre el grupo control y refugio.

FIGURA 39 - ANOVA Simple – Explora - olfatea - Stock Swiss F0

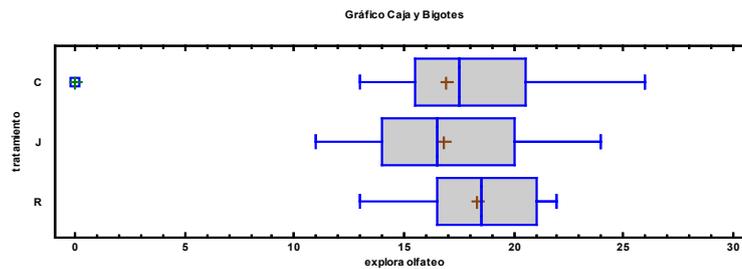


FIGURA 40 - ANOVA Simple – Explora - olfatea - Stock Swiss F1

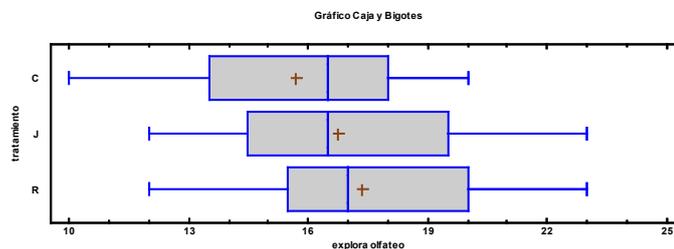


TABLA 41 - Conducta Exploración sobre sus miembros posteriores, Stock Swiss, resumen estadístico entre grupos

ratones Swiss - F0 Exploración s/miembr. post	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
Promedio	16,25	21,083	23,666
DS	8,781	9,2191	9,604
Varianza	77,113	84,992	92,242
ratones Swiss - F1 Exploración s/miembr. post	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
Promedio	35,66	31,33	35,41
DS	13,786	12,456	14,45
Varianza	190,05	155,15	208,81

TABLA 42 - Conducta Exploración sobre sus miembros posteriores, Stock Swiss, comparación entre grupos

EXPLORACION S/ MIEMBROS POSTERIOR			
STOCK	Control vs refugio	Control vs juguete	Refugio vs Juguete
Swiss F0	NS	NS	NS
Swiss F1	NS	NS	NS

Para la conducta exploración en dos patas no hubo diferencias significativas entre grupos con enriquecimiento y los controles.

FIGURA 41 - ANOVA Simple – Exploración sobre sus miembros posteriores– StockSwiss F0

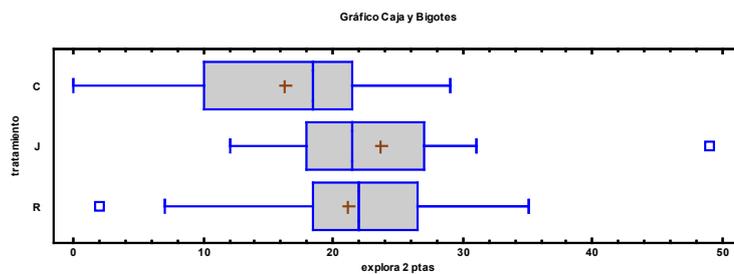


FIGURA 42 - ANOVA Simple – Exploración en sobre sus miembros posteriores– StockSwiss F1

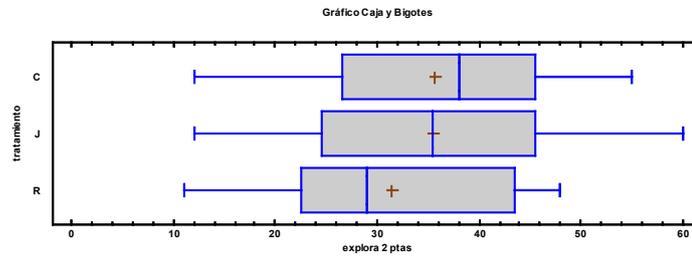


TABLA 43- Conducta Desplazamiento por el centro, Stock Swiss, resumen estadístico entre grupos

ratones Swiss - F0 Desplazamiento por el centro	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
Promedio	1,75	0	0,417
DS	2,701	0	1,164
Varianza	7.295	0	1.356
ratones Swiss - F1 Desplazamiento por el centro	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
Promedio	16,08	13,75	17,41
DS	9,423	3,91	5,664
Varianza	88,81	15,295	32,083

TABLA 44- Conducta Desplazamiento por el centro, Stock Swiss, comparación entre grupos

DESPLAZAMIENTO POR EL CENTRO			
STOCK	Control vs refugio	Control vs juguete	Refugio vs Juguete
Swiss F0	NS	SIG	NS
Swiss F1	SIG	SIG	NS

Para la conducta desplazamiento por el centro hubo diferencias significativas en los grupo control (de mayor varianza) y el de enriquecimiento juguete en los Swiss F0, y

para este stock en la F1 hubo diferencias significativas entre grupo control y ambos grupos con enriquecimiento.

Swiss F0: $F= 2,68$ para $p<0.05$, y la razón de $\sigma^2=5,38$; se rechazaría la H_0 , hay diferencias significativas entre grupos control y juguete.

Swiss F1: $F= 2,68$ para $p<0.05$, $\gamma\sigma^2=5,8063$; se rechazaría la H_0 , hay diferencias significativas entre grupos control y refugio.

FIGURA 43 - Kruskal – Wallis – Desplazamiento por el centro -Stock Swiss F0

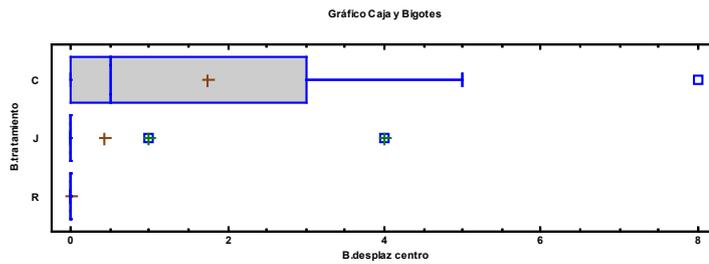
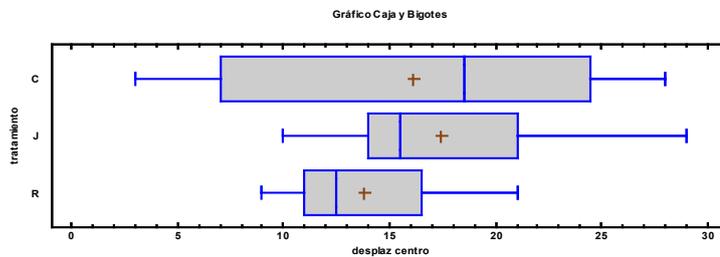


FIGURA 44 - ANOVA Simple, Desplazamiento por el centro, StockSwiss F1



Agrupación de relaciones de varianzas entre grupos

TABLA 45 - Relaciones de varianza – Stock Swiss – comparación entre grupos control y juguete

Niveles significativos: REL VARIANZAS CONTROL vs JUGUETE			
CONDUCTA	CONTROL	STOCK	JUGUETE
DESPLAZAM. POR EL CENTRO	**	Swiss F0	
	**	Swiss F1	

Al agrupar las relaciones de varianzas entre grupos control versus juguete se observa que la varianza fue mayor (**) en los grupos control para las conductas descritas en el gráfico anterior para la línea y en ambas generaciones.

TABLA 46 - Relaciones de varianza – Stock Swiss – comparación entre grupos control y refugio

Niveles significativos: REL VARIANZAS CONTROL vs REFUGIO			
CONDUCTA	CONTROL	STOCK	REFUGIO
DESPLAZAM. BORDE OO	**	Swiss F0	
EXPLORAR OLFATEO	**	Swiss F0	
DESPLAZAM. CENTRO	**	Swiss F1	

Al agrupar las relaciones de varianzas entre grupos control versus refugio se observa la varianza fue mayor (**) en los grupos control para las conductas descritas en el gráfico anterior en ambas generaciones.

TABLA 47 - Relaciones de varianza –Stock Swiss – comparación entre grupos refugio y refugio

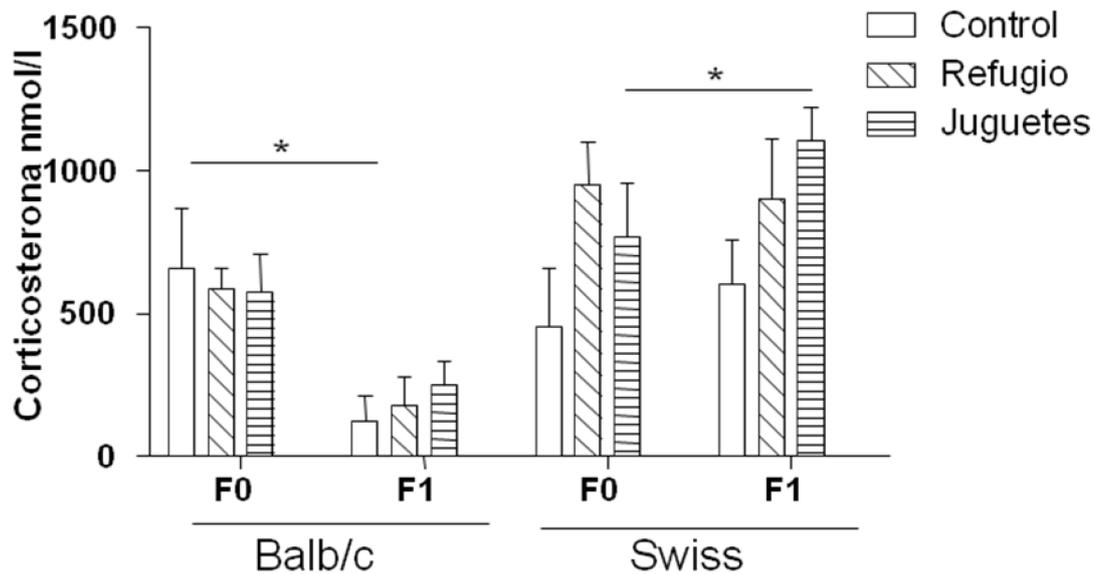
Niveles significativos: REL VARIANZAS REFUGIO vs JUGUETE			
CONDUCTA	Refugio	STOCK	juguete
DESPLAZAM. BORDE VV		Swiss F0	**
DESPLAZAM. BORDE OO		Swiss F0	**
ORINAR		Swiss F0	**
CORTICOSTERONA	**	Swiss F1	

Al agrupar las relaciones de varianzas entre los grupos refugio versus juguete se observa que la varianza fue mayor (**) para los grupos con enriquecimiento juguete en las conductas descritas en el gráfico anterior en la generación F0 excepto para los Swiss F1 en donde para la corticosterona el valor de la varianza es mayor para el grupo con enriquecimiento refugio.

5.3 RESULTADOS DE LOS VALORES DE CORTICOSTERONA

Para el segundo objetivo de este estudio se analizaron los valores de corticosterona entre grupos controles y enriquecidos, tanto para los ratones de la cepa BALB/c y el stock Swiss.

FIGURA45 - Valores de corticosterona comparación de ambas generaciones entre BALB/c y Swiss.



Valores de corticosterona entre grupos controles y con enriquecimientos para la cepa BALB/c y el stock Swiss, se analizan para cada uno y ambas generaciones. Las muestras fueron tomadas luego de haber estado cada uno de los individuos de cada grupo en el ensayo de campo abierto durante 10 minutos. Datos analizados por ANOVA de dos vías ($p < 0,05$).

Del análisis estadístico se observaron diferencias significativas entre la F1 y F0 de la cepa de ratones BALB/c ($p < 0,05$). Para el stock Swiss se observan diferencias

significativas entre la F0 y F1 entre los grupos con enriquecimientos juguete (p<0,05).

TABLA 48 - Corticosterona, Cepa BALB/c, resumen estadístico de grupos

ratones BALB/c - F0 Corticosterona	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
promedio	659,57	588,66	574,28
DS	726,07	245,39	462,08
Varianza	527178	60218,7	213523
ratones BALB/c - F1 Corticosterona	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
promedio	120,5	195,66	198,41
DS	307,19	329,86	311,43
Varianza	94365,08	108811,57	96986,77

TABLA49 - Corticosterona, Cepa BALB/c, comparación entre grupos

CORTICOSTERONA			
Cepa	Control vs Refugio	Control vs juguete	Refugio vs Juguete
BALB/c F0	NS	NS	NS
BALB/c F1	NS	NS	NS

Para la medición de corticosterona no hubo diferencias significativas entre los grupos controles y con enriquecimientos para la cepa BALB/c, tanto en la F0 como en la F1.

FIGURA 46 - Kruskal – Wallis – Corticosterona - cepa BALB/c – F0

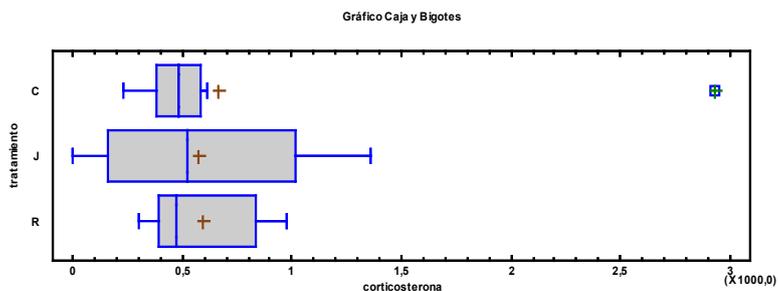


FIGURA 47 - Kruskal – Wallis – Corticosterona - cepa BALB/c – F1

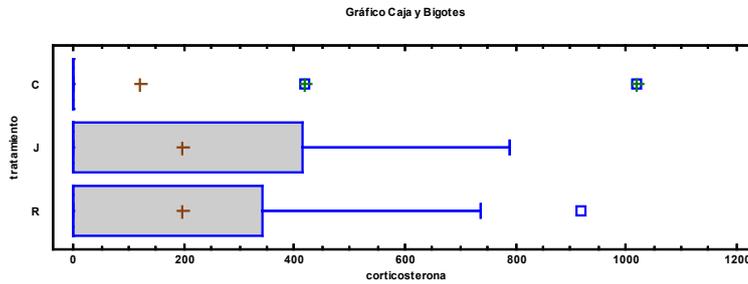


TABLA 50 - Corticosterona, Stock Swiss, resumen estadístico entre grupos

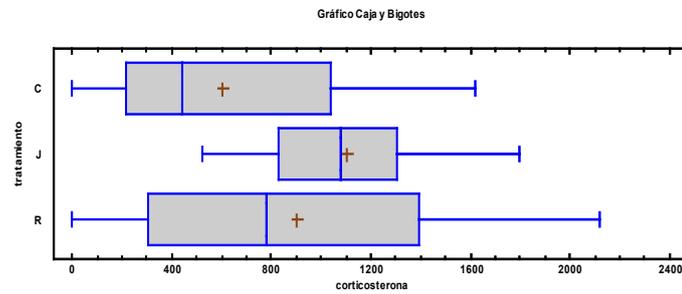
ratones Swiss - F0 Corticosterona	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
Promedio	452,833	953,167	767,667
DS	704,468	507,501	648,371
Varianza	496275,16	257557,26	420384,95
ratones Swiss - F1 Corticosterona	grupo control	grupo refugio	grupo juguete
Promedio	605	900	1106
DS	528,803	726,037	388,04
Varianza	279632,6	527129,7	150575

TABLA 51 - Corticosterona, Stock Swiss, comparación entre grupos

CORTICOSTERONA			
STOCK	Control vs refugio	Control vs juguete	Refugio vs juguete
Swiss F0	NS	NS	NS
Swiss F1	NS	NS	SIG

Para la medición de corticosterona hubo diferencias significativas el stock Swiss en la F1 entre grupos con enriquecimiento. $F = 2,68$ para $p < 0.05$ y $\sigma^2 = 3,5007$; se rechaza la H_0 , hay diferencias significativas entre los grupos con enriquecimiento.

FIGURA 48 - ANOVA Simple, Corticosterona, Stock Swiss F1



De la comparación de corticosterona entre los grupos control y con enriquecimiento, para la generación F0 no hubo diferencias significativas en las varianzas, sin embargo si se observaron diferencias entre grupos enriquecidos en la generación F1.

5.4 RESULTADOS DE LAS CONDUCTAS DE LAS MADRES F1 PARA CON SUS CRÍAS

Para el tercer objetivo de este estudio se analizaron los resultados de la comparación de conductas para con sus crías entre madres (F1) provenientes de grupos enriquecidos y las de los grupos control, tanto para la cepa BALB/c como para el stock Swiss, los cuales no mostraron diferencias significativas entre ambos tipos de grupos. El tamaño de la muestra para cada caso fue pequeña, por lo que esta información se presenta en carácter anecdótica. Sin embargo se comprobó que los cuidados maternos filiales (acicalamiento) fueron más importantes que en la cepa BALB/c. Para el caso de los ratones del stock Swiss se observó que comenzaban a armar un nido a los 15 minutos en promedio luego de proceder al cambio de la caja mientras que para los BALB/c lo realizaban a los 25 minutos. Tanto para los ratones BALB/c como para los Swiss de los grupos con enriquecimiento del tipo refugio se constató que arman el nido antes que los ratones de los otros grupos (juguete y control). Las frecuencias de acicalamiento de las madres hacia las crías fueron mayores en los ratones Swiss que en los BALB/c lo mismo que la recuperación y traslado de las mismas a lo que será en el futuro su lugar de anidación.

6 DISCUSION:

Los datos obtenidos a partir de este trabajo aportaron claras evidencias de que no es posible aplicar diferentes tipos de enriquecimiento ambiental, con el solo objetivo de mejorar el bienestar animal, sin tener en cuenta los distintos comportamientos que expresan los animales, en este caso, tanto la cepa BALB/c como el stock Swiss.

Se observó que hubo marcadas diferencias en el comportamiento de los ratones exo y endocriados del presente estudio.

Se confirmó que brindar un ambiente enriquecido para los ratones de experimentación no genera más variabilidad que uno sin enriquecer, pero enriquecer el ambiente sin tener en claro el objetivo que se pretende lograr con determinado enriquecimiento y no medir su relevancia puede ser perjudicial.

Por lo expuesto anteriormente y dado que se trabajó con ratones exogámicos y endogámicos, he considerado realizar una discusión final independiente para cada modelo animal:

6.1 RATONES BALB/c:

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten afirmar que:

De la comparación dentro de la generación F0 de esta cepa (que nunca recibió enriquecimiento ambiental previamente) tanto en los controles como en los grupos enriquecidos no se obtuvieron diferencias significativas para la varianza de las conductas pasivas. Esto mismo se repite en la generación de los hijos F1 de la misma cepa, criados desde el nacimiento con los mismos tipos de enriquecimiento

según los padres de los que provenían, excepto para el comportamiento defecar donde sí existieron diferencias significativas y el valor de la varianza fue mayor en los animales del grupo control. La defecación es indicador de estrés en los animales ante una situación desconocida como el campo abierto y aquí se demuestra la importancia del enriquecimiento, ya que los animales de estos grupos se comportaron de manera más natural ante esa situación nueva comparada con los animales del grupo control.

Dentro de las conductas activas, la conducta de desplazamiento por los bordes del campo abierto en vaivén, tanto en la generación F0 como en la F1 de esta cepa no se evidenció ninguna diferencia significativa de las varianzas entre los grupos control y los enriquecidos con refugio y juguete. Por lo tanto, esta observación apoya la hipótesis de que el enriquecimiento ambiental no genera más variabilidad en comparación con la de los grupos control en los cuales el enriquecimiento estuvo ausente.

Para el comportamiento de desplazamiento por los bordes del campo abierto recorriendo círculos completos hubo diferencias significativas entre las varianzas de los grupos control y refugio tanto en las generaciones F0 y F1, siendo en ambos casos mayor la varianza en los del grupo control. Por lo tanto, esta observación también apoya la hipótesis de que el enriquecimiento ambiental genera menos variabilidad en los grupos enriquecidos. Para este mismo comportamiento hubo diferencias significativas entre los grupos control y juguete solo en la generación F0, mientras que en la generación F1 la diferencia entre ambos no fue significativa. Se observó que los individuos del grupo control se comportaban más activamente a

diferencia de los del grupo juguete cuyos movimientos fueron más escasos sugiriendo que los animales con este enriquecimiento no manifestaron tanta ansiedad debido a la nueva situación.

Para el comportamiento de exploración olfateo en el campo abierto hubo diferencias significativas entre las varianzas de los grupos control y en ambos grupos de enriquecimiento en la generación F0, siendo en los dos casos mayor en los grupos enriquecidos que en el control. En este último se evidenció menor predisposición para realizar esta conducta que en los individuos con enriquecimiento. Sin embargo, en la generación F1 no se observaron diferencias significativas entre los ratones control y los de los grupos con enriquecimiento. Los enriquecidos se mostraron más desinhibidos para explorar el nuevo ambiente respecto de los ratones control.

Para la conducta de exploración sobre sus miembros posteriores hubo diferencias significativas en el campo abierto entre los animales del grupo control y los grupos con enriquecimiento refugio en ambas generaciones F0 y F1, siendo en ambos casos mayor la varianza para los ratones del grupo control. Por lo tanto esta observación apoya la hipótesis de que el enriquecimiento ambiental no genera más variabilidad que la observada en los grupos control. Para esta misma conducta no hubo diferencias significativas entre los grupos control y los con enriquecimiento juguete para las generaciones F0 y F1 respectivamente.

Para la conducta de desplazamiento atravesando el centro del campo abierto no se detectaron diferencias significativas entre las varianzas de los grupos control y los enriquecidos para la generación F0, por lo tanto esta observación apoya la hipótesis

de que el enriquecimiento ambiental genera igual o menos variabilidad que la de los grupos control; sin embargo entre estos y los enriquecidos con juguete en la generación F1, se observó un comportamiento diferente siendo manifiestamente mayor la varianza para los del grupo control. Los animales de este grupo fueron más activos en este tipo de comportamiento que los del grupo juguete.

6.2 RATONES Swiss:

Los resultados obtenidos para este stock permiten afirmar que:

De la comparación de todos los grupos experimentales entre la generación F0 y la generación F1, en ningún caso se observaron diferencias significativas entre la varianza de los grupos control y la de los ratones con enriquecimiento refugio y juguete para todas las conductas pasivas. Lo mismo se observó en las comparaciones entre estos grupos dentro de cada generación F0 y F1 respectivamente. Por lo tanto estos resultados confirman la hipótesis de que el enriquecimiento ambiental no genera más variabilidad en los grupos con enriquecimiento que en los grupos control.

Para las conductas activas tanto para la generación F0 como para la generación F1, no se evidenciaron diferencias significativas entre la varianza de los grupos con y sin enriquecimiento para las conductas de desplazamiento por los bordes del campo abierto en vaivén. Por lo tanto esta observación apoya la hipótesis de que el enriquecimiento ambiental genera menos variabilidad que cuando no se implementa.

Para el comportamiento de desplazamiento por los bordes del campo abierto recorriendo círculos completos hubo diferencias significativas entre las varianzas del

grupo control y refugio para la generación F0, siendo mayor la varianza para el grupo control. Por lo tanto esta observación confirma y afirma la hipótesis de que el enriquecimiento ambiental no genera más variabilidad. Para la generación F1 no hubo diferencias significativas entre grupos control y refugio. Entre los ratones del grupo control y los del grupo juguete no hubo diferencias significativas en ninguna de las generaciones.

Para el comportamiento de exploración olfateo en el campo abierto hubo diferencias significativas entre las varianzas del grupo control y del grupo refugio para la generación F0, siendo mayor la varianza para el grupo control, por lo tanto esta observación apoya la hipótesis de que el enriquecimiento ambiental no genera más variabilidad. Para la F1 no se observaron diferencias significativas entre controles y ambos grupos con enriquecimiento.

Para la conducta de exploración sobre sus miembros posteriores en el campo abierto no hubo diferencias significativas entre las varianzas de los grupos control y las de ambos enriquecimiento tanto en la generación F0 como en la F1. Por lo tanto esta observación confirma la hipótesis de que el enriquecimiento ambiental genera menos variabilidad que cuando no se implementa enriquecimiento, habiéndose comprobado que no se observaron cambios en el comportamiento en ninguna de las generaciones.

Para la conducta desplazamiento por el centro del campo abierto no hubo diferencias significativas entre el grupo control y el grupo refugio en la generación F0, pero sí existió esa diferencia para la generación F1 siendo mayor la varianza

para los grupos control. Esto sugiere que el enriquecimiento genera menos variabilidad que la de los grupos no enriquecidos.

La comparación entre los grupos control y el enriquecimiento juguete mostró diferencias significativas en ambas generaciones F0 y F1, siendo mayor la varianza en los grupos control estableciendo de la misma manera que el enriquecimiento genera menos variabilidad.

Los tipos de enriquecimiento seleccionados como fueron refugio y juguete, se eligieron para dar lugar a pautas de comportamiento diferentes. El de tipo refugio (maple de huevos de cartón) para mejorar su bienestar tomando en cuenta la necesidad que tienen los ratones de construir un nido y para propiciarles un ambiente protegido. El de tipo juguete para brindarles bienestar pensando en sus necesidades comportamentales de roer, mediante la colocación de un objeto (poliedro de madera) para que puedan desarrollar esta actividad y no redirigirla hacia barrotes o bordes de la caja.

A partir del análisis de las conductas desarrolladas entre los grupos control y enriquecidos se concluyó que, tanto para la cepa BALB/c como para el stock Swiss, las varianzas de los grupos control son mayores que las de los grupos con enriquecimiento por lo cual a partir de los resultados que se obtuvieron se puede establecer que el enriquecimiento del ambiente no genera mayor variabilidad.

Del análisis comparativo entre ambos tipos de enriquecimiento se observó que el correspondiente a juguete genera mayor varianza que el de tipo refugio tanto para los BALB/c como para los Swiss. El enriquecimiento juguete exacerba la mayoría de las

conductas activas cuando lo comparamos con el del tipo refugio, siendo más evidente esta situación en los ratones Swiss que en los BALB/c.

Además de los tipos de enriquecimientos que se evaluaron en este estudio, el objetivo perseguido con los mismos se contradice con la predicción, ya que, en el caso del refugio, no siempre resultó en el uso del mismo como tal debido a que muchas veces lo manipularon y utilizaron para construir un nido (Feld A. y col. 2010).

En este sentido es de destacar lo sostenido por Nam-Mi Gross y col. (2011), que para los ratones de laboratorio el recurso crítico lo constituye el hecho de tener un material para la construcción de un nido y esto contribuye al desarrollo normal del cerebro y del comportamiento; por lo cual se estima que para el ratón la construcción del nido es más importante que contar con un refugio. Esta aseveración se corresponde con todos los modelos de ratones de laboratorio.

Para las conductas pasivas, los ratones BALB/c de los grupos controles defecan más en la F1, mientras que en los Swiss no hay diferencias significativas. Esto denota la importancia que ejerce el enriquecimiento en una generación de ratones que han sido criados en ambientes modificados, y los animales que provienen de ese medioambiente enriquecido toman a la nueva situación como es el campo abierto de forma más natural y se estresan menos que sus pares del grupo control.

Para la cepa de ratones BALB/c las conductas defecar y freezing son de relevancia comparado con el stock Swiss en donde éstas pasan desapercibidas o están ausentes.

En las conductas activas en los ratones BALB/c, el enriquecimiento refugio tiene mayor relevancia que el juguete cuando se lo compara con los controles ya que es cuando se evidencian mayores diferencias en las generaciones, principalmente en la F0 y generalmente en los ratones de los grupos refugio, la varianza fue menor que en la de los controles. En la F1 esa diferencia se mantiene para algunas conductas y en otras no existe, sugiriendo que el enriquecimiento plantea una acción sobre el desarrollo o no de la conducta. La mayoría de las pautas comportamentales activas la desarrollan contra el borde del campo abierto evitando el centro. En los animales con enriquecimiento se detectó una menor frecuencia de manifestación de las conductas activas que en la de los animales control apoyando lo observado por Van de Weerd y col. 2003, quienes sugieren que podrían adaptarse a las nuevas condiciones más rápidamente.

En el caso de los ratones Swiss, en sus conductas activas, el enriquecimiento refugio tiene mayor relevancia que el juguete cuando se lo compara con los grupos control ya que es donde se evidencian mayores diferencias, principalmente en las generaciones F0, en las cuales la varianza de los grupos refugio fue menor que la de los controles. En la F1 esas diferencias entre controles y enriquecidos desaparecen indicando que el enriquecimiento plantea una acción sobre el desarrollo o no de la pauta de conducta.

Comparados con los BALB/c, es de destacar que los Swiss presentan mayor actividad locomotora en general y atraviesan sin inconvenientes el centro del campo abierto lo cual sugiere un comportamiento anti ansiedad de este stock coincidiendo con las apreciaciones de Lipkind y col, 2004.

Si bien no hubo diferencias significativas entre las generaciones de los grupos control y con enriquecimiento, la conducta freezing fue muy importante en los ratones BALB/c comparado con la de los Swiss, los cuales no mostraron este tipo de comportamiento.

Asimismo se constató que los ratones Swiss son mucho más activos y defecan menos comparado con los BALB/c coincidiendo con Archer (1973), Walsh & Cummins (1976), quienes sugieren que en los primeros demuestran menos manifestaciones emotivas que los segundos. Esto es de vital importancia al seleccionar el modelo animal con que se va a trabajar.

Manosevitz & Montemayor (1972) y Henderson (1976) a su vez sugieren que los enriquecimientos producen los efectos mencionados por los autores precedentes debido a interacciones entre actividad y exploración, pero también debido a componentes genéticos que son diferentes en la endo y exocría los cuales juegan un rol fundamental.

De la interacción entre ambientes enriquecidos y no enriquecidos en la comparación de conductas entre madres para con sus crías, si bien no se detectaron diferencias significativas entre los grupos, se destaca en general la construcción de un nido mejor formado en los grupos enriquecidos con el tipo refugio y que la atención (acicalamiento) para con las crías es baja en los BALB/c y mayor en los Swiss. Esto coincide con lo observado por Shoji H. y col. 2006, quien afirma que los ratones BALB/c son los menos implicados en el cuidado de las crías que otras cepas de ratones.

Del análisis de corticosterona en este estudio se concluye que para la cepa BALB/c hay una marcada diferencia entre generaciones, siendo menores los valores de todos los grupos (control y enriquecidos) en la generación F1 respecto de los grupos de la F0. En cambio para el stock Swiss la relación es a la inversa y solo se manifiestan diferencias significativas para los ratones de los grupos enriquecidos con juguete.

De estos hallazgos se puede argumentar que este parámetro fisiológico utilizado para evaluar estrés sea de mayor utilidad en estudios de mayor duración y no en ensayos de corta duración como sugieren Walls y colaboradores (1976) y en cambio pueden ser útiles otros parámetros más sensitivos como el peso de grasa marron, el tejido adiposo del epidídimo o de las glándulas adrenales (Benefield A., y col, 2005).

7 CONCLUSIONES

- ✓ El enriquecimiento del ambiente no genera mayor variabilidad que un ambiente no enriquecido.
- ✓ El enriquecimiento del tipo refugio elegido es muy significativo para ambos tipos de ratones para el desarrollo de su comportamiento.
- ✓ Los valores de la varianza para corticosterona no se condicen con los esperados visto el comportamiento observado en el campo abierto.
- ✓ Para la interacción entre madres para con sus crías provenientes de ambientes enriquecidos y no enriquecidos en la comparación de conductas es deseable profundizar estos estudios con mayor detalle en próximas experiencias.
- ✓ Es recomendable destacar la importancia que tiene el hecho de establecer un programa de enriquecimiento ambiental (EA) para los ratones que se utilizan en experimentación y que para dicha implementación se deberá tener en cuenta la cepa o stock, ya que los resultados obtenidos en este trabajo permiten afirmar que las respuestas serán diferentes en cada caso.
- ✓ Estas diferencias demuestran que la elección y la implementación de combinaciones de enriquecimiento del ambiente requieren de evaluaciones científicas previas, donde los procedimientos de manejo de la colonia, el acervo genético, el ambiente de los animales y el tipo de enriquecimiento aplicado deben ser conocidos y ponderados.

- ✓ Asimismo estos resultados demuestran que es imprescindible mencionar en los trabajos científicos qué tipos de EA se aplicó en la experiencia con esos animales
- ✓ Es recomendable que los investigadores realicen un análisis exhaustivo sobre la elección del modelo animal, interiorizándose si provienen de un ambiente enriquecido o no, ya que se obtendrán resultados muy diferentes para cada caso en aquellos trabajos de investigación, diagnóstico o control de calidad.
- ✓ Y en lo que concierne a los bioterios de producción de ratones, sería importante que, antes de implementar un programa de enriquecimiento ambiental, se realizaran estudios y se evaluaran las diferentes posibilidades de modificación del microambiente para cada cepa o stock en particular, dado que, si bien el enriquecimiento genera conductas y beneficia el bienestar de los animales, los comportamientos resultantes son diferentes para cada modelo de ratón.

8CONSIDERACIONES ETICAS

Todos los procedimientos experimentales que se llevaron a cabo con animales en este proyecto se realizaron de acuerdo con las recomendaciones sobre bienestar animal establecidas por FELASA (Federation of European Laboratory Animal Associations) y por la Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio ILAR, NRC, USA (Institute of Laboratory Animal Resources, Nacional Research Council) y ha sido evaluado por el Comité Institucional para Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de la FCV – UNLP con el código02-09-10T.

9BIBLIOGRAFÍA

1. Anon, Animal Welfare Committee looks animal rights. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1990; 196 (1): 17.
2. Archer J. Tests for emotionality in rats and mice: A review. Animal Behaviour 1973. 21(2):205-35.
3. Augustsson A, Dalhborn K, Meyerson B. Exploration and risk assessment in female wild house mice and two laboratory strains. Physiology and Behaviour. 2005, 84: 265 – 267.
4. Augustsson A, Meyerson B. Exploration and risk assessment: a comparative study of male house mice (*Mus musculus musculus*) and two laboratory strains. Physiology and Behaviour. 2004, 81: 685 – 698.
5. Barton, R.A., Dunbar, R.I.M., 1997. Evolution of the social brain. In: Whiten, A., Byrne, R.W. (Eds.), Machiavellian.
6. Baumans V. The welfare of laboratory mice. In: Kaliste E, ed. The Welfare of Laboratory Animals. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 2004. 119-152.
7. Baumans V. Environmental enrichment: a right for rodents!. In: Balls M., Van Zeller E, Halder M. (Eds), Progress in the Reduction, Refinement and Replacement of Animal Experimentation. Elsevier, Ámsterdam. 2000, 1251 – 1255.

8. Baumans, V. Environmental enrichment: Practical applications. In: Van Zutphen LFM. & Balls M. (Eds.), *Animals, alternatives, welfare and ethics* Amsterdam: Elsevier. 1997, 187 – 191.
9. Baumans V., *Making Lives Easier for Animals in Research Labs*. 2002. AWI. Pp 105
10. Bayne K. Normal and abnormal behaviors of laboratory animals: What do they mean?. *Lab Animal*, 1996. 25(1): 21 – 24.
11. Beat Wechsler. *Applied Animal Behaviour Science* 43 (1995) 123-134.
12. Beaver BV. Environmental enrichment for laboratory animals. *ILAR News*, 1989, 31(2), 5 – 11.
13. Benn D.M. Innovations in research animal care. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1995. 206, 465 – 468.
14. Benefield A. Dong W., Greenough W. Mandatory enriched housing of laboratory animal. The need for evidence-based evaluation. *ILAR Journal*. 2005. 46 (2), 95-105.
15. Bevan, William. Sound-precipitated convulsions: 1947-1954. *Psychological Bulletin*, Vol 52(6), 1955, 473-504.
16. Benavidez F., Guénet J.L., *Manual de genética de roedores de laboratorio. Principios básicos y aplicaciones*. 2005. Editores: Universidad de Alcalá, Sociedad Española para las Ciencias de Animales de Laboratorio.

17. Benus, R.F. Aggression and coping: differences in behavioural strategies between aggressive and nonaggressive male mice. 1988. PhD Thesis. University of Groningen.
18. Benus, R.F., Bohus, B., Koolhaas, J.M. and van Oortmerssen, G.A.,. Heritable variation in aggression as a reflection of individual coping strategies. *Experientia* 1991 - 47, 1008 - 1019
19. Benus, R.F., Koolhaas, J.M. and van Oortmerssen, G.A. Individual differences in behavioural reaction to changing environmental in mice and rats. 1987In: *Behaviour*.100, 1, p. 105-12117 p.
20. Berdoy M. *Ratlife* 2002. Available online (www.ratlife.org).
21. Berson DM, Dunn FA, Takao M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*. 2002; 295:1070–1073.
22. Beynen AC, Gärtner K, & Van Zutphen LFM. Standardization of animal experimentation. In Van Zutphen LFM, Baumans V, & Beynen AC. (Eds.), *Principles of laboratory animal science*. Amsterdam: Elsevier. 1993, 101 – 108.
23. Bohus B, Koolhaas JM, Nyakas C. Steffens AB, FokkemaDS, Scheurink AJW. Physiology of stress: a Behaviour view. In: Wiepkema PR, Adrichem PWM van, eds. *Biology of stress in farm animals: an integrative approach*. Dordrecht: Nijhoff Publ, 1987: 57-70.
24. Broom, D.M. *The Evolution of Morality and Religion*. 2003. Cambridge University Press, Cambridge.
25. Broom D. The evolution of morality. *Applied Animal Behaviour Science* 100 (2006) 20–28.

26. Calhoun J.B. The ecology and sociology of the Norway rat. 1962 - Washington DC: Government Printing Office.
27. Calvente S. "La especie inventiva: Similitudes y diferencias entre humanos y animales en la filosofía de Hume". Revista Latinoamericana de Filosofía. 2016. Vol. XLII N°2 – 125 – 147.
28. Chamove AS. Environmental enrichment: A review. *Animal Technology*, 1989. 40: 155 – 178.
29. Chance MRA, & Russell WMS. The benefits of giving experimental animals the best possible environment. In: V. Reinhardt (Ed.), *Comfortable quarters for laboratory animals*. Washington, DC: Animal Welfare Institute. 1997, 12 – 15.
30. Chance MRA. Environmental factors influencing gonadotrophin assay in the rat. *Nature*. 1956, 177:228 – 229.
31. Chance MRA. The contribution of environment to uniformity. *Collected Papers of the Laboratory Animals Bureau*, 1957, 6: 59 – 73.
32. Charukeshi Chandrasekera, From sentience to science: Limits of antropocentric cognition (Commentary on Broom on Animal Welfare). *Animal Sentience* 2016.048: Commentary on Broom on Animal Welfare.
33. Clough G., Environmental effects on animals used in biomedical research. *Biol. Rev.*(1982), 57, pp. 487 – 523.
34. Coates M., Gustafsson B. The Germ Free Animal in Biomedical Research. 1984. Ed. *Laboratory Animals Handbook*.

35. Coppinger R., Coppinger L. Dogs: A startling new understanding of canine origin, behavior & evolution. Simon & Schuster ed. 2001. 352 pp.
36. Council of Europe. Resolution on the Accommodation and Care of Laboratory Animals, 1997, adopted by the Multilateral Consultation on 30 May.
37. Daniel Perals, Andrea S. Griffin, Ignasi Bartomeus, Daniel Sol. Revisiting the open-field test: what does it really tell us about animal personality? *Animal Behaviour* 123 (2017) 69 - 79
38. Dawkins M. From an animal's point of view: Motivation, fitness, and animal welfare. *Behavioral and Brain Sciences*, Volume 13, Issue 1. March 1990, pp. 1-9
39. Dean SW. Environmental enrichment of laboratory animals used in regulatory toxicology studies. *Lab. Anim.* 1999; 33(4): 309 – 327.
40. Douglas Lewis. Varlinskaya E., Spear L. Willey. During conditioned active and passive behavior in the defensive burying/probe avoidance paradigm: effects *Periodicals, Inc. Dev. Psychobiol*, 2004. 45: 153 – 162.
41. Duncan. Behaviour and a behavior needs. *Poultry Science* 1998. 77:1766–1772.
42. Eskola S, Lauhikari M, Voipio HM, Laitinen M, & Nevalainen T. Environmental enrichment may alter the number of rats needed to achieve statistical significance. *Scandinavian Journal Laboratory Animal Science*. 1999, 26: 134 – 144.

43. Fajzi K., Reinhardt V., Smith M. A review of environmental enrichment strategies for singly caged nonhuman primates, *Lab Animal*, 1989, volume 18, number 2.
44. Feld A., Hernandez G., Racciatti D., Gonzalez Ciccía P., Ferrari H.R. Uso de enriquecimiento ambiental en forma diferente a la esperada ¿estereotipia o disparo al vacío? Un estudio de caso. XXVIII Encuentro Anual de Etología y II Simposio Latino-americano de Etología UNIFAL-MG, 12 al 15 de noviembre de 2010.
45. Fernández-Teruel A, Giménez-Llorat L, Escorihuela R, Gil L, Aguilar R, Steimer T., *et al.* Early life handling stimulation and environmental enrichment are some of their effects mediated by similar neural mechanisms?. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*. 2002, 73: 233 – 245.
46. Ferrari, Hector. La transdisciplina, una necesidad vital. *Infovet*, noviembre 2010 año XV, nº 113 número especial, pag. 11.
47. Foster, H., Small D., Fox J. *The Mouse in Biomedical Research*. 1981. Volumen I: History, Genetics and Wild Mice.
48. Foster, H., Small D., Fox J. *The Mouse in Biomedical Research*. 1983. Volumen III: Husbandry.
49. Foster, H., Small D., Fox J. *The Mouse in Biomedical Research*. 1984. Volumen IV: Experimental Biology.
50. Fraser, D. 2004; Applying science to animal welfare standards en *Proceedings de la Global conference on animal welfare: an OIE initiative Paris*, 23–25

February 2004, pp. 121-132, a changing environment in mice and rats. Behaviour, 100: 105-122.

51. Gärtner K. Cage enrichment occasionally increases deviation of quantitative traits. In: J. Tur-Marí & J. M. Orallana-Mariana (Eds.), Animals research and welfare: Partnership. London: Laboratory Animals.1999. p. 207.
52. Gärtner K., Büttner D., Döhler k., Friedler R., Lindena J., Trauschol I. Stress response of rats to handling and experimental procedures. Lab Anim. 1980. Vol 14 (3), 267 – 274.
53. Gamble M. Sound and its significance for laboratory animals. Biol. Rev. (1982). 57. pp .395 – 421.
54. Grier J.W., Burk T. Biology of animal behavior, 2nd ed. 1992, in Understanding biodiversity, D. Ziegler, 2007.
55. Gurney N. L. Effect of early social experience on adult aggressive behavior in C57BL/10 Mice. Camp. and Physiol. Psych.1954, 47 : 326-330.
56. Halliday T.R. Slater PJB, ed. Animal behaviour. 1983. Oxford: Blackwell Scient. Publ.
57. Handbook of Laboratory Animal Science. Animal Model.1994.Vol II. Edited by Per Svendesen and Jan Hau.
58. Hare-Wobber-Wrangham, The self-domestication hypothesis: evolution of bonobo psychology is due to selection against aggression. Animal Behavior , 2012, Vol.:83, pp: 573-585

59. Hare B, Tomasello M. Human-like social skills in dogs? Trends Cogn Sci. 2005 Sep;9(9):439-44.
60. Hau-Schapiro. The welfare of non human primates; en The Welfare of Laboratory Animals. 2007. Edited by Eila Kaliste , pp: 291-314.
61. Hawkins P. 2002. Recognizing and assessing pain, suffering and distress in laboratory animals: a survey of current practice in the UK, with recommendations. Labs Animal 36 (4) 378 – 395
62. Hawkins P. Morton D.B., Burman O., Denninson N., Honnes P., Jennings M., Lane S., Middleton V., Roughan J. V., Wells S., Westwood K., 2011. A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals: 11 th report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAQ Joint Working Group on Refinement Laboratory Animals. 45, 1 – 13.
63. Hedrich H. Genetic Monitoring of Inbred Strains of Rats. 1990.
64. Henderson N. Short exposures to enriched environments can increase genetic variability of behavior in mice. Developmental Psychology - Volume 9, Issue 6 November 1976. Pages 549–553.
65. International Committee on Laboratory Animals: Terms and Definitions. ICLAS 1964. Bull N° 14. London.
66. Jensen P, Toates FM. Who needs behavioral needs? Motivational aspects of the needs of animals. Applied Animal Behavior Science. 1993. 37, 161 – 181.

67. Jensen – Toates, Stress as a state of motivational systems. Applied animal behaviour science, 1997 Vol.: 53 pp: 145-156.
68. King, J. A. Social behavior, social organization and population dynamics in a black-tailed prairiedog town in the Black Hills of South Dakota. Contr. 1955. Lab. Vert. Bioi., Univ. Mich., No. 67, 123 pp.
69. Koolhaas, J.M., Fokkema, D.S., Bohus, B. and van Oortmerssen, G.A., 1986. Individual differences in blood pressure reactivity and behavior in male rats. In: biological and Physiological Factors in Cardiovascular disease. Heidelberg Springer Verlag – 517- 529.
70. Kornerup - Hansen A. Report of the COE working group on rodents and rabbits. Revista de Ciencia 23 – 24., Abstracts of Scientific Papers of the ICLAS – FELASSA conference, Palma de Mallorca, Spain, May 1999. p. 88.
71. Korte, S.M., Bouws, G.A.H., Koolhaas, J.M. and Bohus, B., 1992. Neuroendocrine and behavioral responses. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, Vol 60,Número 3.
72. Kroshko J, Clubb R, Harper L, Mellor E, Moherenschlager A, Mason G. 2016. Stereotypic route tracing in captive Carnivora is predicted by species-typical home range sizes and hunting styles, Animal Behaviour 117. 197-209.
73. Langford D., Bailey A., Chanda M., Clarke S., Drummond T., Echols S., Glick S., Ingrao J., Klassen-Ross T., LaCroix-Fralish M., Matsumiya L., Sorge R., Sotocinal S., Tabaka J., Wong D., Van den Maagdenberg M., Ferrari M., Craig D., Mogil J. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. 2010. DOI; 10. 1038. Nature Methods. 1455.

74. Line S.W. Environmental enrichment for laboratory primates. *J. Am Vet Med Assoc.* 1987. Apr 1;190(7):854-9.
75. Lipkind D, Sakov A., Kafkafi N., Elmer G., Benjamini Y., Golani I. *J. Appl. Physiol.* 97; 2004, 347 – 359
76. Love JA. Group housing: Meeting the physical and social needs of the laboratory rabbit. *Lab Anim. Sci.* 1994. 44:5-11.
77. Lyon M., Searle A. Genetic variants and strains of the laboratory mouse. 1989. Second edition.
78. Manosevitz M. Early environmental enrichment and mouse behavior. *J Comp Physiol Psychol*, 1970, 71(3): 459 – 466.
79. Manosevitz, M; Montemayor, R.J. Interaction of environmental enrichment and genotype. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, Vol 79(1), Apr 1972, 67-76.
80. Manser CE, Broom DM, Overend P, Morris TM. Investigations into the preferences of laboratory rats for nestboxes and nesting materials. *Lab Anim.* 1998. 32:23-35
81. Manual of Microbiological Monitoring of Laboratory Animals. 1994. Second Edition. Editors U.S. Department of Health and Human Service, National Institute of Health.
82. Markowitz H, Gavazzi A. Eleven principles for improving the quality of captive animal life. *Lab Animal*, 1995, 24 (4): 30 – 33.

- 83.** Markowitz, H and Line S. The need for responsive environments. In Rollin B.E., ed. *The Experimental Animal in Biomedical Research*, CRC Press: Florida. 1990, vol I: 153 - 170.
- 84.** Martino P., Gentilini E., Reinoso H. Echeverría M., Leardini N., Copes J. *Microbiología Veterinaria*. 2007. 2da Edición. Editor Néstor Stanchi. Argentina.
- 85.** Maschi, F., Principi, G., Juárez, F., Rogers, E., Corva, S., Carbone, C. 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”. *Rev. Medicina Veterinaria*. 2012, 93, 3/4: 39 – 43.
- 86.** Mason G.J. Stereotypies: a critical review. *Anim. Behav.* 1991. 41, 1015–1037.
- 87.** McSheehy, T. Overview of the state of the art in environmental monitoring. In: Melby, E.C. Jr. and Balk, M.W., eds. *The importance of laboratory animal genetics, health, and the environment in biomedical research*. Toronto, Ont.: Academic Press, 1983; 161-182.
- 88.** Mednik S.A. A learning theory approach to research in schizophrenia. *Psychological bulletin*, 1958. 55 (5), 316 - 327.
- 89.** Mendl M., Paul E., Do animals live in the present? Current evidence and implications for welfare. *Applied Animal Behaviour Science* 113 (2008) 357–382.
- 90.** Mellor DJ, Reid CSW. 1994. Concepts of animal well-being and predicting the impact of procedures on experimental animals. In: *improving the well being of animal in research*. Baker, Mellor & Jenking (Eds). Pp 3- 18.

91. Moberg, G.P. Biological response to stress: key to assessment of animal well-being? 1985. In: G.P. Moberg (Eds). *Animal stress*: Bethesda: American Physiological Society.
92. Morton DB, Jennings M, Batchelor GR, Bell D, Birke L, Davies K, Eveleigh JR, Gunn D, Heath M, Howard B, Koder P, Phillips J, Poole T, Sainsbury AW, Sales GD, Smith DJA, Stauffacher M, Turner RJ. Refinements in rabbit husbandry. Second report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. 1993. *Lab Anim* 27:301-329.
93. Nam-Mi Gross A., Engel A., Wurbel H. S. Simply a nest? Effects of different enrichment on stereotypic and anxiety – related behavior in mice. *Applied Animal Behaviour Science*. 134 (2011) 239-245.
94. Nevison C.M. Why do male ICR(CD-1) mice perform bar-related(stereotypic) behaviour?. *Behavioural Processes* 47 (1999) 95–111.
95. Newberry R. -Environmental enrichment: Increasing the biological relevance of captive environments. *Applied Animal Behaviour Science* 44 (1995). 229-243
96. Newton. Environmental impact on laboratory animals. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*. (1978) 22: pp1-24
97. Oderberg, F.O. Future research directions. In: Lawrence, A.B. and Rushen, J. (eds) *Stereotypic Animal Behaviour: Fundamentals and Applications to Welfare*. CAB International, Wallingford, UK, (1993) pp. 173–192.

98. Olsson AS, Nevison Ch, Patterson-Kane E, Sherwin Ch, Van de Weerd H, Würbel H. Understanding behavior: the relevance of ethological approaches in laboratory animal science. *Applied Animal Behaviour Science*. 2003, 81: 245 – 264.
99. Phil L, Hau J. Faecal corticosterone and immunoglobulin A in young adult rats. *Laboratory Animals*. 2003, 37: 166 – 171.
100. Poole T. *The UFAW Handbook on the care and Management of Laboratory Animals*. 2010. Harlow, Longman Scientific & Technical, UK. Tenth Edition.
101. Poole TB. Meeting a mammal's psychological needs: Basic principles. *Second Nature – Environmental enrichment for captive animals*. 1998. Smithsonian Institution Press. Pp 83 - 97.
102. Prior H, Sacher N. Effects of enrichment housing environment on the behaviour of the young male and female mice in four exploratory tasks. *Jour Exp Anim Sci*. 1994/1995, 37: 57 – 68.
103. Rodent Refinement Working Party. Refining rodent husbandry: the Mouse. *Lab Anim*, 1998,32: 233 – 259.
104. Rose, MA. Environmental factors likely to impact on an animal's well-being - An overview. In: Baker RM, Jenkin G, & Mellor DJ. (Eds.), *Improving the well-being of animals in the research environment*. Sydney, Australia: ANZCCART. 1994, 99 –116.

105. Russel WMS, Burch R.L. The principle of humane experimental technique. 1959. Methuen, London.
106. Russell, WMS. Enhancing animal comfort in the laboratory. *Humane Innovations and Alternatives*, 1994. 8:601 – 605.
107. Scharmann W. Housing of mice in an enriched environment. In: Bunyan J, editor. *Welfare and science, proc. 5th symp. fed. europ. lab. anim. sci. assoc.*, Brighton 1993. London: Royal Soc. Med. Press; 1994. 335 – 337.
108. Semple-Rowland S.L. y Dawson W., Retinal cyclic light damage threshold for albino rats. *Lab. Anim. Sci.* 1987; 37: 289-298.
109. Shepherdson DJ. Tracing the path of environmental enrichment in zoos. In: Shepherdson DJ, Mellen JD, Hutchins M, eds. *Second Nature: Environmental Enrichment for Captive Animals*. 1998. Washington: Smithsonian Institution Press. pp 1-12.
110. Shoji H., Kato K. Maternal behavior of primiparous females in inbred strains of mice: A detailed descriptive analysis. 2006. *Physiology & Behavior* 89 (2006) 320–328.
111. Sorensen D., *Animal Welfare: an introduction*. E. Kaliste (ed.). *The Welfare of Laboratory Animals*. 2007 Springer. 3-14.
112. Stamp-Dawkins M. *Animal suffering*. 1980. London: Chapman and Hall,

113. Stauffacher M. 1995. Environmental enrichment, fact and fiction. In: Environmental enrichment information resources for laboratory animals. AWIC Resource Series. 1995;2: 145–9
114. Stauffacher M. Housing requirements: What ethology can tell us. In: Van Zutphen LFM, Balls M, eds. *Animal Alternatives, Welfare and Ethics*. 1997a. Amsterdam: Elsevier Science BV. p 179-186.
115. Stauffacher M. Comparative studies on housing conditions. In: O'Donoghue PN, ed. *Harmonization of Laboratory Animal Husbandry*. 1997b. London: Royal Society of Medicine Press. p 5-9.
116. Stauffacher M. Refinement in rabbit housing and husbandry. In: Balls M, van Zeller AM, Halder M, eds. *Progress in the Reduction, Refinement and Replacement of Animal Experimentation, Developments in Animal and Veterinary Sciences, 2000*. Amsterdam: Elsevier Science BV. p 1269-1277
117. Tolman, E. C. Cognitive maps in rats and men. *Psychological review*, 1948. 55(4), 189.
118. Thorpe W. *Learning and Instincts in animals*. 2ed, London Methuen. In *animal behaviour*, Aubrey Maning & Marian Dawkins, 1963. 6th ed. 2012.
119. Townsend P. Use of in-cage shelters by laboratory rats. *Anim Welf* 1997, 6:95-103.
120. Tuffey A.A. *Laboratory Animals. An introduction for Experimenters*. 1995. Second Edition. Ed. Wiley.

- 121.** Van de Weerd HA, Baumanns V, Koolhaas JM, Van Zutphen LFM. Strain Specific behavioural response to environmental enrichment in the mouse. *Journal of experimental animal science*, 1994, 36: 117 - 127.
- 122.** Van de Weerd HA, Baumanns V. Environmental enrichment in rodents. In: *Environmental enrichment resources for laboratory animals. AWIC Resource Series 2*, 1995, 145 - 149.
- 123.** Van de Weerd HA, Van Loo PLP, Van Zutphen LFM, Koolhaas JM, Baumanns V. Preferences for nesting material as environmental enrichment for laboratory mice. *Appl Anim Beh Science*. 1998. 55, 369 – 82.
- 124.** Van de Weerd, HA. Environmental enrichment for laboratory mice: Preferences and consequences. Unpublished doctoral dissertation, Utrecht University, The Netherlands. 1996.
- 125.** Van Loo PLP, Kruitwagen CLJJ, Koolhaas JM; Van de Weerd HA; Van Zutphen LFM; Baumans V. Influence of cage enrichment on aggressive behavior and physiological parameters in male mice. *Applied Animal Behaviour Science*. 76 2002, 65 - 81.
- 126.** Van Loo PLP, Kruitwagen CLJJ, Koolhaas JM, Van de Weerd HA, Van Zutphen LFM, Baumans V. Influence of cage enrichment on aggressive behaviour and physiological parameters in male mice. *J Appl Anim Behav Sci* 2002. 76:65-81.
- 127.** Van Zutphen, Baumans V., Beynen A., *Principios de la Ciencia del Animal de Laboratorio*. 1993. Editorial ELSEVIER.

128. Van Zutphen LFM, Hedrich HJ, & Van Oortmerssen GA. Genetic standardization. In L. F. M. Van Zutphen V, Baumans, & AC Beynen. (Eds.), Principles of laboratory animal science. Amsterdam: Elsevier. 1993. 127–142.
129. Vessell E.S. and Lang C. M. Environmental and genetics factors affecting laboratory animals: impact on biomedical research. Federal proceedings. 1976, 35: 1123 – 65.
130. Von Holst, D. Coping behaviour and stress physiology in male tree shrews (*Tupaia belangeri*). In: J. Comp. Physiol. 1985. 78,289–306.
131. Walsh, R.N., and Rk Cummins. The open-field test. A critical review. Psychological Bulletin. 1976.-83: 482-504.
132. Ward GE, Fiat RA, DeMille D Environmental enrichment for laboratory mice. Animal Technology (1991) 42, 149–56
133. Wechsler. Coping and coping strategies: a behavioural view. Applied Animal Behaviour Science, 1995. Vol.: 43, pp: 123-134
134. Weiss. Psychological factors in stress and disease, Scientific American, June, 1972, reprinted in Atkinson and Atkinson (Eds) Mind and Behaviour, Freeman, San Francisco, 1980.
135. Weiss, J.M., Effects of coping responses on stress. J. Comp. Physiol. Psychol., 1968. 65: 251-260.

- 136.** Welfare of Laboratory Animals. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. ISBN 1-4020-2270-0 (HR) P.O. Box 17, 3300AA *Dordrecht*, The Netherlands.
- 137.** Wemelsfelder F. Boredom and laboratory animal welfare. In: Rollin BE, Kesel ML, editors. Vol. 1. The experimental animal in biomedical research, Boca Raton FL: CRC Press, Ann Arbor, Boston. 1990. 243–272.
- 138.** Wemelsfelder F. Animal boredom—A model of chronic suffering in captive animals and its consequences for environmental enrichment. *Humane Innovations and Alternatives*, 1994.8, 587–591.
- 139.** Wemelsfelder, F. Life in captivity: its lack of opportunities for variable behaviour. *Applied Animal Behaviour Science*, 1997. Vol: 54 pp: 67-70.
- 140.** Wiepkema, P.R. and Schouten, W.G.P. Mechanisms of coping in social situations. 1990. In: Zayan R and Danzer R (eds) *Social Stress in Domestic Animals*.
- 141.** Wiepkema, P.R., Broom, D.M., Duncan, I.J.H. and van Putten, G., 1983. Abnormal Behaviours in Farm Animals.
- 142.** Würbel H, Chapman R, Rutland C. Effect of feed and environmental enrichment on development of stereotypic wire-gnawing in laboratory mice. *Appl Anim Behav Sci*; 1998. 60(1):69 – 81.
- 143.** Zayan René, Dantzer Robert. Social stress in domestic animals. .1990. In: Dordrecht by Kluwer .
- 144.** Young RJ. Environmental enrichment for captive animals. 2003. UFAW. Edit Blackwell.

- 145.** Zeuner F., A History of Domesticated Animals.Hutchinson, London, 1963. 84s.
Volume 7, Issue 2-3 p. 132p.
- 146.** Zuñiga J., Tur Marí J., Milocco S., Piñeiro R. Ciencia y Tecnología en
Protección y Experimentación Animal. 2001. Editorial Mc Graw Hill.