

# CAPÍTULO 11

## El ratón como animal de experimentación

*Miguel Ángel Ayala*

El ratón es el animal más utilizado en las pruebas de diagnóstico e investigación. Conjuntamente con el pez y la rata alcanzan al 90 % de todos los animales usados con fines científicos. La disponibilidad comercial, su pequeño tamaño, vida relativamente corta, su alta tasa reproductiva, su bajo costo de mantenimiento y la adaptación a la explotación en grandes colonias, permitieron que sea una de las especies de laboratorio más estudiadas. El conocimiento completo de su genoma, su anatomía, su fisiología, su amplia variabilidad genética, la aparición de enfermedades espontáneas, la susceptibilidad a agentes químicos y microbianos, han permitido desarrollar modelos animales de enfermedades similares a las desarrolladas en el humano y en otras especies animales.

De todas estas características hay tres que debemos resaltar:

- Debido a que soportan bien la consanguinidad, es posible obtener cepas que son virtualmente homocigotas para todos sus loci por medio de la endocria.
- Es posible criar híbridos viables y fértiles por cruzamientos de cepas de laboratorio con varias especies derivadas de animales salvajes.
- Se ha conseguido realizar las técnicas de transgénesis que producen alteraciones heredables del genoma casi a pedido.

### Origen

El ratón doméstico (*Mus musculus*) pertenece al orden de los roedores que con casi sus 2000 especies constituye el orden de mamíferos más numeroso. A su vez pertenece al suborden de los miomorfos, que tiene el de mayor número de especies dentro del orden. La palabra *Mus* proviene del griego, del latín y del sanscrito, y en todos significa: *robar*.

En la naturaleza existe un grupo de especies que aún siguen sin diferenciarse y que pueden hibridarse, por eso se las clasifica como subespecies. Actualmente existen cuatro:

- *Mus musculus domesticus* distribuido en Europa oriental, Africa, Arabia y Medio Oriente y transportada por el hombre a América.
- *Mus musculus musculus* distribuido por Europa oriental, Japón, China y Rusia.
- *Mus musculus castaneus* distribuido por Ceilán y Sudeste Asiático.
- *Mus musculus bactrianus* distribuido por Pakistán, Irán y la India.

El origen se sitúa en el Sudeste Asiático (India), donde se encontró un fósil de 7 millones de años. Unos 6000 años a.C. ya se encontraban en Turquía y posteriormente se difundieron por Europa con las invasiones romanas. Llegan a América a fines del siglo XV con la conquista (Benavidez 2003).

## Origen de las cepas de ratones de laboratorio

El establecimiento de líneas de ratones estandarizados o caracterizados, se debe mucho a su existencia previa como tradición de cría y venta como mascotas. En siglo XVIII y XIX criadores asiáticos y europeos comenzaban a seleccionar y desarrollar una variedad de mutantes.

La cría de ratones por los biólogos condujo a una amplia variabilidad genética, lo que despertó el interés para emplearlo como animal de laboratorio, hecho que iniciaron los científicos a fines del siglo XIX.

Todas las cepas o stocks de ratones de laboratorio existentes derivan de cruces entre ratones salvajes y de criaderos. Estudios sobre el cromosoma revelan que la mayoría de las cepas de laboratorio están formadas por un mosaico de dos subespecies; *mus musculus musculus* y *mus musculus domesticus* por lo que las cepas clásicas de laboratorio pueden considerarse recombinantes inter subespecíficas no existentes en la naturaleza y a las cuales podrían referirse como *Mus "laboratorius"*.

La primera línea obtenida genéticamente homogénea (consanguínea) de ratones fue la DBA, realizada por Little en la Universidad de Harvard, en 1909. Luego en 1918 Little se muda al Cold Spring Harbor Laboratory y ahí se desarrollan las líneas C57BL/6, C57BL/10, C3H, CBA y la BALB/c (Benavidez 2003).

## Taxonomía

Clase:	Mamífero
Orden:	Rodentia
Suborden:	Myomorpha
Familia:	Muridae
Género:	<i>Mus</i>
Especie:	<i>musculus</i>

## Biología general

El ratón doméstico es una especie cosmopolita, comensal del hombre, que se adapta ampliamente a una gran variedad de condiciones ambientales y climáticas, desde zonas muy frías

hasta regiones tropicales. En general la especie prefiere lugares más secos que húmedos; son de hábitos nocturnos. Posee un agudo sentido de la audición, y responde a un amplio rango de secuencias ultrasónicas, por ejemplo, cuando las crías salen del nido, emiten sonidos ultrasónicos que inmediatamente son percibidos por la madre. En el laboratorio los ratones se alteran por sonidos de muy baja frecuencia, por lo que hay que tener cuidado con los equipos que se utilizan dentro del mismo o en sus cercanías (Green E. 1975).

El sentido del olfato está muy desarrollado, no sólo para detectar el alimento y depredadores, sino también para percibir un orden social, se sabe que olores extraños por ejemplo asociados con los humanos pueden producir respuestas por estrés (Dhanjal 1991).

La visión es muy pobre, la retina tiene muy pocos conos, y por lo tanto no pueden percibir los colores; solo perciben muy poco el color rojo; es por esto que los ratones dependen más de las marcas por olor, emisiones audibles o ultrasónicas y estímulos táctiles, que de la visión.

El sistema social depende de la densidad de población, viven en grandes colonias y el rango social está bien determinado.

Generalmente son muy dóciles a excepción de algunos stocks exocriados que mantienen su agresividad al igual que sus antecesores salvajes.

Por su pequeño tamaño corporal son muy susceptibles a cambios ambientales, aún pequeños cambios de temperatura (2-3 °C) pueden afectar la temperatura corporal del animal y modificar su fisiología.

El tamaño del ratón adulto varía entre 12 a 15 cm. desde la punta de la nariz a la punta de la cola. El largo de la cola es igual al largo del cuerpo. El recién nacido pesa entre 1 a 2 gr. y gana rápidamente peso durante la lactancia. El tamaño del cuerpo del adulto varía de acuerdo a variables intrínsecas: genotipo, sexo y edad y a variables extrínsecas: dieta, número de ratones por caja y temperatura ambiental (Green E. 1975).

Muchos factores ambientales y genéticos influyen sobre la longevidad del ratón, entre estos factores se encuentra la dieta, la densidad animal por caja, las infecciones subclínicas, los métodos de apareamiento, la predisposición genética a tumores, la cepa, el sexo y la presencia o ausencia de genes mutantes deletéreos.

En general, los ratones híbridos, producto del cruzamiento entre dos cepas puras, viven más que los parentales. Las cepas de ratones genéticamente modificados generalmente tienen corta vida solo algunos meses; mientras que otras cepas longevas viven entre 24-30 y hasta 36 meses. (Benavidez 2003).

## **Comportamiento**

El ratón de laboratorio es un animal sociable y, usualmente, se mantiene en grupos sin ningún inconveniente. Estos grupos deben formarse rápidamente luego del destete; sin embargo, los machos de ciertas cepas como por ejemplo HRS/J, BALB/cJ, SJL/J, comienzan a mostrar su agresividad entre la séptima y décima semana de edad, aun cuando estos grupos se hayan

establecido al destete. Las hembras generalmente no pelean, incluso cuando se hayan agrupado siendo ya adultas. (Fox J. 2006)

No hay razón científica que demuestre que los ratones no pueden sufrir dolor, angustia o sufrimiento como otros vertebrados; de hecho, su sistema nervioso central y periférico comparte características anatómicas y funcionales con el humano (Resasco A. 2018)

El ratón normalmente divide su caja en áreas específicas para dormir, comer, orinar y defecar. Los ratones de laboratorio muy ocasionalmente sacan la comida del comedero para almacenarla en una esquina de la caja. El acto de comer es cíclico, con un pico máximo durante el período de oscuridad. Tienen preferencia por los cereales, como por ejemplo trigo, arroz, cebada, etc., y toman agua también durante las horas de oscuridad. La cantidad del agua consumida varía considerablemente entre las diferentes cepas endocriadas, y algunas como por ejemplo MA/MyJ, STR, y SWR/J pueden desarrollar polidipsia.

Las hembras parturientas construyen un nido y permanecen mucho tiempo cerca del mismo o sobre las crías. Tanto la hembra como el macho, limpian a los neonatos y evitan que otras crías se acerquen al nido (Resasco 2018). El canibalismo de los ratones jóvenes puede ser un serio problema en colonias endocriadas. La manipulación de los recién nacidos debe hacerse de manera suave y tranquila, y devolver la camada al nido lo más pronto posible.

## Usos en el laboratorio

El ratón es el animal más utilizado en el laboratorio por su pequeño tamaño, su fácil manejo y su bajo costo de mantenimiento comparado con especies de mayor tamaño (Fox J. 2007)

Debido a su vida relativamente corta, son excelentes para su uso en ensayos crónicos de toxicología, microbiología, virología, gerontología, oncología, parasitología, farmacología, inmunología, embriología, teratología, en estudios genéticos, etc. Por compartir tantas características anatómicas y funcionales con el sistema nervioso humano se los utiliza como modelo en ensayos de analgésicos, antidepresivos y ansiolíticos (Fox J., 2006)

Existen diversas líneas de ratones mutantes naturales e inducidos por diversas técnicas, que reproducen modelos de diferentes enfermedades, similares a las ocurridas en el hombre y otras especies animales; entre algunas de ellas podemos nombrar: diabetes, hipertensión, cáncer, desórdenes de la visión, enfermedades autoinmunes, desórdenes de la audición, enfermedades de huesos y cartílagos, desórdenes neurológicos, inmunodeficiencias, arteriosclerosis, etc. (Benavidez F., 2003)

## **Macroambiente**

### **Temperatura**

La temperatura de las habitaciones debe mantenerse entre los 18°C y los 25 C°, siendo la más adecuada entre los 22 C°+/- 2 y la humedad relativa entre 40 y 70%, cuando la humedad es inferior a estos parámetros se produce el síndrome de la cola anillada o ring tail (Fox J 2006).

### **Ventilación**

La ventilación es importante para controlar la humedad, el calor, y los gases tóxicos. Se deben hacer entre 10 y 14 recambios del volumen total del aire de la sala por hora. Lo que se debe lograr es una correcta entrada y salida de aire, y esto es posible colocándolas de forma que ambas queden enfrentadas (Zúñiga 2015).

### **Iluminación**

La iluminación es importante para la regulación del ciclo estral y reproductivo. Se recomienda una intensidad de 40 lux a la altura de las cajas y brindar 12 hs luz/12 hs oscuridad. En ceapas albinas si la iluminación es muy intensa se puede observar fototoxicidad (Zúñiga 2015).

### **Ruidos**

Los ratones son muy sensibles a los ruidos, por lo que estos deben evitarse cuando se trabaja con ellos.

### **Olores**

Son muy sensibles a los olores ya que irritan las vías respiratorias. Debe evitarse utilizar desinfectantes con perfume.

## **Microambiente**

### **Cajas**

Los ratones que se utilizan con propósitos experimentales se alojan en cajas metálicas, o de plástico transparente policarbonato o polipropileno que son más livianas provistas de tapas enrejadas de acero inoxidable. Estas cajas se colocan en estanterías comunes, generalmente de metal y con ruedas para facilitar la limpieza y el manejo de las mismas. También existen cabinas aisladoras para colocar las cajas y racks ventilados. En otros países existen laboratorios en donde el lugar del lavadero no es muy amplio como para poder lavar y desinfectar todo el material, por lo que se utilizan cajas descartables.

### Densidad animal

En el caso de los ratones adultos (con un peso aproximado de 30 gr.) se requiere una superficie mínima de 97 cm<sup>2</sup> por animal, superficie que debe aumentarse hasta 390 cm<sup>2</sup> en el caso de las hembras lactantes con su camada. En todos los casos la altura de las paredes de la caja no debe ser inferior a 15 cm y en cajas de tamaño estándar en cuanto a la densidad animal, se aconseja colocar de 3 a 5 ratones

### Camas

Las camas deben estar libres de polvillo, deben ser absorbentes, atóxicas, no producir alergias y deben ser esterilizables. En este sentido, cabe señalar como las más adecuadas la viruta blanca de álamo, la roja no se aconseja ya que puede teñir al animal y provocar alteraciones en la relación entre ellos, además de activar algunas enzimas hepáticas pudiendo alterar los resultados de los ensayos. (Resasco A. 2018). El pino no se aconseja por tener mucha resina. También se puede utilizar papel de celulosa, o marlo de maíz pero teniendo en cuenta que con él no pueden construir el nido por lo que debemos proporcionarle material para que lo hagan, como algodón, papel, cartón, Se recomienda la limpieza y desinfección de las cajas una vez por semana, dependiendo de la cepa y de la ventilación del ambiente, por ejemplo la cepa CF1, de mayor tamaño, debe cambiarse dos veces por semana, mientras que la BALB/c de tamaño menor puede cambiarse solo una vez por semana. El lecho debe mantenerse seco, pero teniendo en cuenta que la limpieza excesiva perturba las marcas olorosas y estresa al animal (Resasco A. 2018, Zúñiga 2015).

### Agua

El agua debe administrarse *ad-libitum*, en mamaderas o en bebederos automáticos. Agua potable la que se puede clorinar, para evitar contaminaciones. También puede esterilizarse por medio de autoclave o por filtración.

### Alimento

El alimento se administra *ad-libitum*, generalmente son preparados comerciales en forma de pellets o extrusado. Debe ser de buena calidad, económico, lo suficientemente duro como para que el animal pueda roer y desgastar sus dientes, y lo suficientemente blando como para que las crías puedan comerlo. Para los animales S.P.F., axénicos y gnotobióticos el alimento debe ser estéril. La esterilización se puede hacer por medio de radiación o autoclave, en este último caso el alimento debe reforzarse por perder nutrientes durante el proceso.

Un ratón adulto diariamente consume aproximadamente 12 gr. de alimento por cada 100 gr. de peso corporal, pero al igual que el agua consumida varía en función de la temperatura ambiente y humedad relativa, sequedad y calidad del alimento, estado reproductivo y sanitario, etc. (Zúñiga 2015).

## Programa reproductivo

El programa reproductivo debe establecerse teniendo en cuenta una serie de premisas, básicamente: espacio e insumos disponibles, fecundidad de la cepa a emplear y esquema de consanguinidad. La ratona es poliéstrica continua. Tras el parto, a las 14 - 28 hs se produce un celo fértil, de manera que, si las necesidades productivas lo exigen, pueden cubrirse. Hay que tener en cuenta que la lactación y gestación simultáneas puede retrasar entre 3 y 5 días la implantación de los embriones.

Al nacer, el ratón de laboratorio pesa un gramo, nacen con los ojos y oídos cerrados, sin pelos, y muy activos. Al tercer día comienza a notárseles el pelo y está completamente cubierto a los 10 días. A los 12 días comienzan a abrir los ojos y el conducto auditivo externo, entre el décimo tercer y décimo cuarto día empiezan a ingerir alimento sólido y agua del bebedero.

Generalmente se los desteta entre los 18 y 21 días de edad con un peso de 10 a 12 gramos.

Cuando no se ha utilizado el estro post-parto las hembras comienzan a ciclar a los 5 días post-destete. (Fox J., 2007)

## Sistemas reproductivos

Los sistemas reproductivos más empleados en las colonias de fundación y expansión son:

- El sistema reproductivo monogámico se realiza colocando un macho y una hembra en una misma caja. Este sistema se utiliza en las colonias de fundación para el mantenimiento permanente del mismo. Las crías que se obtienen se destetan a los 21 días, antes de que se produzca el nuevo nacimiento. Con este sistema, en el que se aprovecha el celo post-parto, se logra un mayor número de camadas, a la vez que permite un correcto control y evaluación de la producción de cada hembra. Como desventaja hay que señalar el elevado número de machos, el desgaste prematuro de la hembra, se requiere mayor cantidad de espacio y la mano de obra utilizada es mayor.
- El sistema reproductivo poligámico se realiza apareando un macho con 2 a 6 hembras. Antes del parto las hembras se llevan a cajas individuales, lo que naturalmente impide aprovechar el celo post-parto. Vuelven a la caja común luego del destete. Como consecuencia, con este sistema la hembra se desgasta menos, lo que se traduce en mayor viabilidad y mayor tamaño de crías destetadas. Como desventaja hay que señalar el menor número de camadas por hembra, un mayor trabajo a desarrollar en cada caja y finalmente el agotamiento de los machos (Benavidez F., 2003).

## Ciclo estral

Tiene una duración de 4 a 5 días, y el celo propiamente dicho dura aproximadamente 12 horas. Durante la lactación se interrumpe la periodicidad ovárica.

En el ratón se producen tres efectos reproductivos muy importantes a tener en cuenta en el manejo de una colonia. El efecto Lee-boot que se produce cuando se colocan grupos homogéneos de hembras, todas ellas dejan de ciclar entrando en un anestro continuo. El Efecto Whitten que es aquél que se produce al agregar un macho o el olor de la cama de un macho, en ese grupo de hembras que se encontraban en anestro continuo, observando que a las 72 horas comienzan a ciclar todas juntas. Este efecto es muy importante porque nos permite sincronizar los celos. El Efecto Bruce es cuando una hembra cubierta por un macho determinado toma contacto físico o se expone al olor de otro macho en las primeras 48 horas de gestación, lo que produce una reabsorción embrionaria.

Las hembras no lactantes tienen un período de gestación que oscila entre 19 y 21 días. En las hembras lactantes éste aumenta entre 3 a 5 días en función al tamaño de la camada.

El diagnóstico de gestación se realiza por la presencia espermatozoides en los frotis vaginales, como así también por la presencia de un tapón vaginal formado por el semen gelificado que se observa en la vagina de la hembra luego de la cubrición o entre el lecho de la caja. Éstos son indicadores concretos que se ha producido la cópula en las 24 horas anteriores.

El tamaño de la camada varía dependiendo de la cepa, la edad de la madre, etc., pero siempre la primera camada es más reducida, siendo las más numerosas entre el segundo y octavo parto. (Benavidez 2003)

## Identificación

Existe una gran variedad de métodos para identificación: indirectos, temporarios y permanentes.

Los indirectos son las tarjetas que se colocan en cada jaula o caja con los datos de los animales.

La identificación permanente incluye caravanas de metal, muescas o tatuajes en las orejas y los implantes subcutáneos de microchips electrónicos, generalmente entre las escápulas para que no se desplacen. La amputación de los dedos no debe realizarse nunca. (Lotus W., 2005)

La identificación temporaria se puede realizar tiñendo la piel de los ratones albinos, cortando el pelo o haciendo marcas en la cola con tinta indeleble. Los dos primeros permiten la identificación por una o dos semanas y las marcas de tinta desaparecen en uno o dos días. Se realiza en la región dorsal de los animales permite la identificación de 10 animales albinos durante una semana.



## Sujeción

Los ratones jóvenes y adultos se sujetan y se levantan tomándolos por la base de la cola o por el cuerpo con los dedos o con pinzas pequeñas de punta roma o pinzas de goma teniendo especial cuidado con los ratones agresivos ya que pueden darse vuelta y morder (Resasco A. 2018). Siempre debemos trabajar tranquilos al manipular al animal. Una vez que se sujeta por la base de la cola el ratón se lleva a la reja de la caja, donde pueda agarrarse, se lo toma por la piel laxa del cuello con los dedos índice y anular; la misma se la da vuelta y se sujeta la cola entre el meñique y la palma de la mano. En ningún caso se lo debe sujetar por la punta de la cola ya que podría arrancársele parte de ella. Las pinzas son excelentes para manipular ratones silvestres o agresivos, y también para tomar los recién nacidos.

Otra forma de sujetarlos es en forma de copa, donde se saca de la caja al animal colocando ambas manos juntas en forma de copa (o nido) y se lo traslada; otra es en forma de túnel donde se utiliza un tubo que generalmente es transparente, se introduce en la caja y se dirige al animal para que entre en este. Al principio pueden saltar, pero rápidamente se acostumbran a estos dos métodos.

También se han diseñado diferentes dispositivos, cepos, para la sujeción y la inmovilización de los ratones. Existen múltiples formas con una amplia variedad de materiales tales como: cuero, tela resistente, tubos plásticos o de acrílico transparente, etc. Muchos de estos dispositivos se diseñaron para facilitar la inoculación endovenosa en la cola, colecta de sangre o irradiación. Todos deben contar con una ventilación adecuada y deben ser de fácil limpieza y desinfección.

## Sexado

La determinación del sexo de los animales se realiza por simple observación de la zona perianal a partir de las tres semanas (antes de la tercera semana es más difícil y requiere más experiencia). Para dicho propósito se evalúa la distancia entre la papila genital y la apertura anal, la cual es casi el doble en los machos que en las hembras. El tamaño de la papila genital es también ligeramente mayor en los machos. Como una alternativa, es posible observar la parte ventral de las crías, entre los días 9 y 15, y distinguir a las hembras por la falta de pelo alrededor de los pezones. También es posible observar una pequeña mancha negra en el escroto de los machos pigmentados desde el primer día de vida (Benavidez 2003)

## Administración de drogas y compuestos o sustancias

En la selección de la vía a utilizar depende de múltiples factores, entre ellos debemos considerar: el pH, la osmolaridad y estabilidad de la sustancia; el efecto y tasa de absorción; la

compatibilidad y solubilidad; y si serán dosis única o múltiple. También es importante tener en cuenta el volumen total, que se expresa en mililitros por kilogramo de peso. Existen variaciones leves asociadas a la cepa, edad y sexo.

Estos procedimientos deben llevarse a cabo por personal entrenado en la ejecución de los mismos y siempre deben ser previamente aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL). Se debe tener en cuenta los volúmenes permitidos en esta especie, volúmenes excesivos puede llevar a una pérdida del bienestar de los animales, en cualquier caso, los valores deben ser ajustados según los requerimientos farmacológicos. En caso de ser necesario administrar volúmenes mayores a los permitidos, el procedimiento debe ser consultado con el coordinador responsable y se deben manejar varios sitios de inoculación (Morton B, Turner P., 2011).

### **Tópica**

La aplicación tópica de los compuestos se realiza generalmente sobre la piel depilada en la zona del dorso del animal. Este es un procedimiento fácil, se debe evitar el lamido para que el animal no ingiera los compuestos aplicados. Se han desarrollado diversos dispositivos para este propósito como por ejemplo collar de Isabelino, bandas y tubos de vidrios para la cola.

### **Oral**

La forma más fácil de administrar un compuesto por vía oral es mezclándolo con la comida o el agua de bebida, pero si le dan un sabor desagradable se reduce considerablemente su consumo. Para asegurar la administración oral de un compuesto se requiere de un sistema de infusión intragástrica continua. Se debe tener un amplio conocimiento de la anatomía de la zona orofaríngea, ya que el orificio esofágico es difícil de observar en los ratones vivos. Para introducir la sonda, el animal debe sujetarse con firmeza y es importante asegurarnos que la cabeza y el cuello queden extendidos formando una sola línea con la espalda. Se introduce la sonda del lado izquierdo por la comisura de los labios en forma lenta y suave a lo largo de la rama mandibular. En este punto el ratón comienza a tragar y la sonda se inserta dentro del esófago, aprovechando el reflejo de deglución. Existen diversos tipos de sonda, se debe tener en cuenta que siempre sea de punta roma y que su largo permita llegar hasta el extremo del esternón. El volumen a inocular es de 0.5 - 1.0 ml.

### **Subcutánea**

La inyección subcutánea (en un volumen de 0.5 a 1 ml en el ratón adulto) se realiza en la piel laxa del cuello usando agujas de medida 26 ½ G. La aguja se inserta debajo de la piel paralela a la columna vertebral.

### **Intradérmica**

La inyección intradérmica se usa para estudios de reacciones inmunológicas o para medir respuesta inmune. También se utiliza la piel depilada en la zona de la espalda y si vemos que

se forma el habón (ampolla que forma el líquido) nos indica que fue bien realizada. Se puede inocular 0,1 ml por sitio de inyección o 0,05 ml en el pulpejo palmar o plantar. La aguja utilizada para esta maniobra es de medida 27G

### **Intracraneal**

Esta vía se utiliza para el ensayo de virus neurotrópicos como por ejemplo el virus rábico, se utilizan animales lactantes. La aguja de medida 27 G para neonatos y de medida 24 G para lactantes. Se inserta bajo la piel en la región central del hueso parietal, lateralmente a la sutura central, esto evita alcanzar el seno venoso transverso. Se rota la aguja lentamente hasta que traspase el hueso, y luego se avanza hasta una profundidad de 1 a 4 mm dependiendo del tamaño del ratón. Se puede inyectar entre 0,015 a 0,03 ml en neonatos y lactantes respectivamente. Las soluciones deben tener una temperatura cercana a la del cuerpo, y luego de la inyección los animales deben mantenerse en lugares templados para reducir la posibilidad de shock.

### **Intramuscular**

Esta vía es muy poco usada, debido a la pequeña masa muscular del ratón. Se utiliza esta vía para sustancias oleosas, siendo el inóculo de 0,05 ml. La inoculación se realiza en la región anterolateral del muslo (grupo de músculos cuádriceps femorales), o en la parte posterior cuidando no dañar el nervio ciático. Utilizando agujas medida 22 a 26 G. Se introduce la aguja en la masa muscular y se lleva el embolo de la jeringa hacia atrás para asegurarnos que no estemos en un vaso sanguíneo, si comprobamos que no estamos dentro de un vaso sanguíneo hacemos la descarga del inóculo.

### **Intraperitoneal**

Para evitar lesionar el hígado, estómago, bazo o ciego la inoculación intraperitoneal debe realizarse en el cuadrante inferior derecho del abdomen. El ratón se coloca en cúbito dorsal levemente inclinado hacia craneal, para que se produzca el desplazamiento de las vísceras hacia adelante. Se divide el abdomen en 4 cuadrantes y luego se inserta la aguja en el cuadrante inferior derecho. Atravesamos piel, se desliza la aguja hacia craneal 1 o 2 mm y se introduce en la cavidad abdominal perpendicularmente a la columna vertebral; esto se hace para evitar que los orificios de inoculación coincidan y se pierda líquido de inóculo o se produzca una contaminación por gérmenes. El volumen a inocular por esta vía es hasta 1 ml, con agujas 23 – 26G

### **Intravenosa**

Esta inoculación se realiza en las venas laterales y dorsal de la cola, es difícil de realizar, se debe inmovilizar previamente al ratón y dilatar las venas con alcohol o calor. Debemos comenzar por la parte más caudal para poder tener intentos sucesivos hacia craneal de la cola en caso de fallar. Si se hace en forma apropiada el líquido fluye fácilmente. En los ratones albinos

las venas se visualizan fácilmente, siendo más difícil en los animales con manto de color. Otros sitios para la inoculación intravenosa puede ser la vena yugular externa, la vena metatarsiana dorsal y la vena sublingual. El volumen a inocular es de 0,01 a 0,2 ml. Las agujas a utilizar dependen del tamaño del ratón, siendo las medidas de 26 a 30 G.

## **Extracción de sangre**

Se han desarrollado varias técnicas para la extracción de sangre en ratón.

El seno orbital no se utiliza más por ser muy doloroso.

### **Vena maxilar externa**

Lateralmente de la mandíbula, sobre la rama mandibular generalmente coincide con el lugar donde el ratón presenta un lunar sin pelo. Se puede realizar con aguja o lanceta. Se obtienen pequeños volúmenes de sangre recogiendo las gotas en tubos eppendorf.

### **Vena safena**

Esta vena atraviesa en forma inclinada la cara externa del muslo. Se rasura y desinfecta la zona y se ejerce una ligera presión para ingurgitar la vena. Se puede realizar con aguja o lanceta. Se obtienen pequeños volúmenes de sangre recogiendo las gotas en tubos eppendorf.

### **Intracardiaca**

Se pueden obtener grandes volúmenes de sangre directamente por punción cardíaca, utilizando diferentes técnicas. Siempre con el animal anestesiado. Se coloca al ratón en decúbito dorsal, se ubica la apófisis xifoides del esternón y se inserta la aguja perpendicularmente a la columna vertebral formando con ella un ángulo de 45°. Si punzamos el corazón se va a sentir el choque cardíaco, se aspira el émbolo y comienza a fluir la sangre. Otra forma es punzar entre el tercer y cuarto espacio intercostal izquierdo, palpando el choque cardíaco. Se utilizan agujas son de 20 a 25G.

En el ratón adulto se obtienen entre 0,8 a 1 ml dependiendo el tamaño y la edad del animal cuando se realiza sangría a blanco.

Cuando la extracción de sangre se debe realizar en forma periódica o seriada debemos tener en cuenta los volúmenes y el tiempo entre una extracción y otra, además de la vía por la cual podemos realizarla. El volumen de sangre dependerá del peso corporal del ratón, se puede sangrar el 1 % del peso corporal cada 2 semanas, el 3% del peso corporal una vez al mes y el 6 % cuando es sangrado a blanco. Por ejemplo, si queremos obtener un volumen del 1% del peso de un ratón de 20 gr., sangramos hasta 0,2 ml, del 3% sangramos 0,6 ml. y del 6% obtenemos hasta 1,2 ml.

## **Características anatómicas particulares**

### **Cavidad oral**

Presenta una dentición monofiodonte, o sea un solo, juego de dientes permanentes. La fórmula dentaria es 2 (I 1/1, C 0/0, PM 0/0, M 3/3) = 16. Los incisivos son hipsodontes, o sea de raíz abierta y crecimiento continuo (por lo que deben roer para desgastarlos), mientras que el resto son braquiodontes.

### **Ojos**

Se encuentran protruidos de la cabeza y son susceptibles a presentar ulceraciones u opacidad corneal.

### **Glándula de Harder**

Se localiza dentro de la órbita ósea. Sus secreciones son pigmentos porfirínicos rojos. Esta secreción se produce ante situaciones de estrés. Y puede confundirse con sangre.

### **Nódulos linfáticos**

Se localizan superficialmente, subcutáneamente, entre músculos y profundamente entre vísceras y cavidad torácica. Son difíciles de observar en animales sanos haciéndose más evidentes en animales que padecen alguna infección, aumentan de tamaño y se observan color rojizo.

### **Timo**

Es par, de forma triangular y está localizado ventralmente de la tráquea. Esta glándula es mayor en animales pequeños, alcanza su tamaño máximo en la madurez sexual, luego disminuye.

### **Corazón**

Se encuentra a lo largo de la línea media del tórax, rodeando de los pulmones. El ápice se encuentra muy cerca del diafragma. Su tamaño en un animal adulto es un poco menor a 1 cm de diámetro.

### **Pulmones**

Presentan un lóbulo simple el izquierdo y 4 lóbulos el derecho. La tráquea está formada por cartílagos incompletos en forma de C, en cambio en los bronquios este cartílago es completo.

### **Grasa Parda**

Conocida también como "glándula de la hibernación", se encuentra entre las escápulas, en la región axilar y cervical. Juega un rol importante en la termogénesis y como reserva de carbohidratos.

### **Estómago**

Se encuentra dividido en 2 regiones, una no glandular, clara y de pared delgada; y otra glandular, de color rosado y paredes espesas que limita con el duodeno.

### **Hígado**

Está compuesto por 4 lóbulos y representa el 5% del peso total del animal adulto. La vesícula biliar se encuentra cerca del lóbulo medio.

### **Bazo**

En forma de lengüeta se dispone a lo largo de la gran curvatura del estómago.

### **Glándulas mamarias**

Presenta 5 pares de mamas.

## **Referencias**

- Benavides F.J. y Guénet J.L. (2003). Manual de Genética de Roedores de Laboratorio Universidad de Alcalá de Henares y la SECAL, España.
- Dhanjal, P. (1991). The Assessment of Stress in Laboratory Mice due to Olfactory Stimulation with Fragranced Odours (MSc project dissertation in toxicology). University of Birmingham.
- Fox J., Barthold S., Davisson M., Newcomer C., Quimby A., (2006) The Mouse in Biomedical Research: Normative Biology, Husbandry, and Models. Volume3. American College of Laboratory Animal Medicine, *Volume (3)* 2<sup>nd</sup> Edition. USA
- Fox J., Davisson M., Barthold S., Newcomer C., Quimby A., (2007). The Mouse in Biomedical Research History, Wild Mice, and Genetics. *Volume (2)* i. American College of Laboratory Animal Medicine Book • Second Edition. USA.
- Green E. (1975). Biology of the laboratory mouse. 2nd ed. Dover Publications, New York. USA
- Lotus W.(2005). A primer on rodent identification methods Laboratory Animal *Volume (34)*, N<sup>o</sup>. 4, 64-67.
- Morton B., jennings S., Buckwell A., Ewbanck R., Godfrey C., Holgate B., Ingles R., James R., Page C., Sharman I., Verchosley R., Westall L. and Wilson A. (2002) Refinando los procedimientos para la administración de sustancias. Laboratory Animas. SECAL. España.
- Resasco A., (2018). *Título:* Impacto del desarrollo de la línea tumoral A549 en el bienestar de ratones de la cepa NLAE:NIH(S)-Fox1nu/nu, Tesis doctoral repositorio de la Facultad de ciencias Veterinarias de Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Turner P., Brabb T., Pekow C. and Vasbinder M. (2011).Administration of Substances to Laboratory Animals: Routes of Administration and Factors to Consider. *Vol (50)*, N<sup>o</sup> 5, 600–613
- Zúñiga JM., Orellana M. y Tur Marí J. (2015). Ciencia y Tecnología del Animal de Laboratorio Universidad de Alcalá de Henares - SECAL España.