

CAPÍTULO 8

Calidad sanitaria de ratas y ratones de experimentación

Cecilia Carbone y Miguel A. Ayala

El animal de experimentación es un instrumento de medida, que como tal debe estar calibrado para que cuando se utilice se logren resultados o mediciones precisas y confiables. A nadie se le ocurriría pesar una sustancia en una balanza que no esté calibrada y tampoco recurriría a la sal de cocina en caso de necesitar una solución de ClNa químicamente pura. Por esta razón la estandarización de los animales de laboratorio es tan importante a la hora de utilizarlos con fines científicos. Esta exigencia sobre la calidad de los animales está íntimamente relacionada con las recomendaciones y estándares internacionales, con el principio de las 3 Rs y fundamentalmente con el bienestar animal.

Los animales de laboratorio son individuos complejos en los que hay que tener en cuenta factores intrínsecos, propios de cada animal, como su condición genética, edad, sexo y ritmo biológico; factores ambientales que influyen en ellos fuertemente, como el lugar de alojamiento, el alimento, agua de bebida, temperatura, lecho y demás componentes del micro y macroambiente. A esto se suma el trato y manejo que ejercen las personas sobre el animal, el grado de severidad de los procedimientos experimentales, la sintiencia, que es la capacidad que tienen los animales de experimentar emociones tanto positivas como negativas, el tiempo que duran los procedimientos, el estrés, dolor, sufrimiento, transporte y el estrés social (Guillen 2012).

Es de notar que las personas no tienen intervención en los factores propios, intrínsecos de los animales, esto indica que la estandarización y calidad de los animales de experimentación dependen de sus propias características y del tipo de manejo, cuidado y uso que se les brinde.

Entre los factores ambientales se encuentran las infecciones, estas se deben a la presencia de microorganismos y son inadmisibles en un animal que se considere que tiene buena calidad sanitaria.

¿Por qué es importante garantizar la calidad sanitaria y microbiológica de los animales de experimentación? En primer lugar, porque los animales pueden estar infectados con microorganismos zoonóticos y esto representa un riesgo importante para las personas y el ambiente. En segundo lugar, debido a que existen evidencias científicas de que todos los microorganismos patógenos y oportunistas producen alteraciones en los animales por lo cual si están infectados dejan de reunir la condición de estar estandarizados o definidos sanitariamente.

Es decir que la condición sanitaria de los animales de experimentación puede influir decisivamente en el bienestar animal y en la validez y confiabilidad de los resultados de las investigaciones. Por lo tanto, es importante que tanto las instalaciones para cría como las experimentales establezcan un programa de vigilancia de la salud animal en los laboratorios (HM, del inglés Health Monitoring) como parte de un sistema de garantía de calidad (Nicklas y col. 2010). Se debe considerar que todos los microorganismos, parásitos, bacterias, virus y hongos, que están presentes contaminando a los animales actúan indefectiblemente como variables experimentales. Esto significa que es fundamental establecer y conocer la categoría microbiológica de los modelos animales ya que se debe tener presente que los microorganismos representan un riesgo para las personas, los animales y para la investigación o ensayo que se esté realizando.

Ahora bien, ¿Cómo surgió la necesidad de estandarizar sanitariamente a los animales de laboratorio? Sucedió que luego de 1945, durante la posguerra, se realizaron experiencias sobre la influencia de la radioactividad utilizando ratones y estos morían muy fácilmente. Esto llevó a las personas involucradas en la investigación a indagar y descubrir que los animales estaban infectados con macroorganismos que interferían en el desarrollo del estudio.

De esta forma se comenzó a considerar de gran importancia la estandarización de los factores ambientales que rodean a los animales, su micro y macroambiente. Asimismo, las instalaciones y aspectos edilicios y el manejo que se realiza dentro del bioterio (Guillén 2012).

Existen una serie de factores que son los que van a hacer posible mantener animales de determinada condición sanitaria en un bioterio:

Infraestructura y equipamiento

Se refiere a la estructura y condiciones que reúne el edificio que aloja a los animales, en el mismo es importante considerar el diseño el cual haga posible establecer una zona limpia, restringida y aislada del exterior circundante, y una zona sucia, además de un sistema de circulación del personal, insumos y animales y que permita la instalación y funcionamiento de barreras sanitarias.

Las barreras sanitarias son un sistema que combina aspectos constructivos, equipos y procedimientos de trabajo que estabilizan las condiciones ambientales de las zonas restringidas reduciendo al mínimo la probabilidad de que organismos patógenos u otros indeseables se pongan en contacto con los animales alojados en dichas zonas.

De manera que absolutamente todos los elementos que vayan a entrar en contacto con los animales deberán ser tratados previo a su ingreso a la zona limpia. Esto incluye fundamentalmente el aire que debe ser filtrado y 100% exterior. También el personal que debe ingresar con indumentaria estéril y estar debidamente entrenado.

Si el bioterio cuenta con infraestructura, equipamiento adecuado, incluyendo el sistema de alojamiento de los animales y con personal debidamente capacitado será posible producir o mantener animales de buena calidad sanitaria.

Por lo tanto, de acuerdo con la presencia o ausencia de microorganismos los ratones y las ratas de laboratorio se clasifican en:

Convencionales

Son animales con su microbiota intestinal normal mantenidos sin ningún proceso especial en instalaciones o sistemas denominados “abiertos”, es decir bajo barreras sanitarias no absolutas. Deben estar libres de toda evidencia de enfermedades infecciosas transmisibles al hombre, tanto en el examen clínico como en el post mórtem. Se refiere a las siguientes entidades biológicas consideradas zoonóticas: *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Streptobacillus moniliformes*, *Virus de la coriomeningitis linfocitaria*, *Virus Hanta*, *Leptospira spp.*, dermatofitos y *Sarcoptes scabiei*

En los animales que pertenecen a esta categoría sanitaria se recomienda realizar un control sanitario cada seis meses.

Libres de patógenos específicos (SPF, del inglés Specific Pathogen Free)

Son animales que poseen su microbiota intestinal normal pero que están libres de un listado de microorganismos infecciosos específicos de la especie. Se obtienen a través de técnicas de histerectomía, la cual se basa en la capacidad que tiene la placenta de filtrar la mayoría de los microorganismos o por transferencia embrionaria. Se debe aclarar que estos procedimientos se realizan solamente para la obtención de los progenitores, ya que, a partir de estos, una vez confirmada su condición sanitaria de SPF, se llevan a cabo programas de apareamiento tradicionales. De esta forma, cuando los científicos usuarios necesitan estos animales, los adquieren en centros de referencia.

Los animales SPF se crían y mantienen en bioterios bajo un sistema combinado de barreras sanitarias absolutas y relativas. El personal técnico que cuida y mantiene a estos animales debe estar debidamente entrenado. Con respecto a la lista de microorganismos que deben estar ausentes, esta ha sido consensuada a nivel internacional, tomando como criterio en primer lugar a aquellos microorganismos potencialmente zoonóticos, seguidos por los de alta prevalencia, capaces de diezmar colonias de ratas y ratones y por último los de baja prevalencia y microorganismos oportunistas que serán indicadores del estado de higiene de la colonia. Una de las listas de referencia a nivel internacional y que se acepta en Argentina es la sugerida por FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations). Para confirmar su condición sanitaria se recomienda realizar tres a cuatro controles sanitarios anuales.

Libres de patógenos específicos y oportunistas: (SOPF, del inglés Specific and Opportunistic Pathogen Free)

En casos en los cuales los animales de experimentación tengan algún compromiso o deficiencia en su sistema inmunitario, también deberán estar ausentes los patógenos oportunistas. La inmunodeficiencia puede deberse a la condición genética de los animales (animales genéticamente modificados) o suscitarse debido a la experiencia a la cual sean sometidos. La mayoría de estos agentes están presentes en el ambiente o son transmitidos por las personas que entran en contacto con los animales. Estos agentes no son patógenos para roedores inmunocompetentes. Sin embargo, en modelos inmunodeficientes o con algún tipo de sensibilidad pueden causar infecciones localizadas o sistémicas.

Tanto los animales SPF como los SOPF se pueden alojar en racks ventilados o también en cajas de ventilación individual (del inglés: individual ventilated cages, IVC) y también en aisladores flexibles o semi flexibles. Sin embargo, los aisladores son costosos y su control y mantenimiento complicado por lo cual en general se usan las dos primeras opciones.

Libres de gérmenes (GF, del inglés Germ Free) o axénicos

Son aquellos animales en los cuales no se detecta ningún microorganismo mediante los métodos hasta ahora conocidos. Carecen de todos los microorganismos, es decir que son individuos microbiológicamente estériles, que tampoco tienen su microbiota normal. Se alojan en aisladores flexibles o semi flexibles estrictamente controlados de manera de evitar contaminaciones, la sala donde se instalan los aisladores debe disponer de barreras sanitarias estrictas. Su control sanitario se recomienda hacerlo cada 15 días

Gnotobióticos del griego, *gnoto* (conocimiento) *bio* (vida)

Son animales axénicos a los que se los ha infectado con uno o más microorganismos, de manera que se transforman en monobióticos, dibióticos o polibióticos de acuerdo con el número de microorganismos presentes (Darnaud y col 2019). Es decir, se trata de un animal cuyo microbiota es totalmente conocida y controlada. Técnicamente, el término también incluye a los animales libres de gérmenes, ya que igualmente se conoce su estado de ausencia de microorganismos.

Al igual que los axénicos, estos animales deben alojarse en aisladores, en ambientes totalmente estériles y ser cuidados y manejados por personal con competencias acorde con los requerimientos de esta condición.

Los animales SPF, SOPF y axénicos se obtienen a través de la técnica de histerectomía la cual se basa en la capacidad que tiene la placenta de filtrar la mayoría de los microorganismos. Se parte de una hembra donadora preñada a término a la que se le realiza la eutanasia mediante dislocación cervical, para inmediatamente extraer el útero grávido y en ambiente totalmente estéril obtener las crías que, una vez que se comprueba que son viables, se las entrega a una nodriza de condición SPF.

Otra técnica, que es actualmente la más utilizada, es la transferencia embrionaria. Para ello se induce la superovulación de las hembras, se obtienen embriones mediante fertilización in vitro que van a transferirse a hembras pseudopreñadas SPF o GF que gestarán y parirán las

crías en aisladores o cajas IVC. Una vez que se cuenta con un núcleo de animales SPF o GF se aparean normalmente.

En los últimos años ha cobrado mucha relevancia la microbiota de los animales de experimentación que es la población microbiana presente en los diferentes ecosistemas del cuerpo, es decir, es el conjunto de microorganismos (predominantemente bacterias, también virus, hongos y protistas), que residen en el cuerpo de los animales (J.O'Rourke 1998). A veces se confunde con el término microbioma, que es mucho más amplio y hace referencia al conjunto de esas comunidades microbianas incluyendo sus genes y metabolitos, así como las condiciones ambientales que les rodean. Estos ecosistemas microbianos se encuentran en el tracto gastrointestinal, genitourinario y respiratorio, la cavidad oral y nasofaríngea, y la piel.

En el caso de los animales que se utilizan con fines científicos el microbiota intestinal es muy importante ya que cada vez, existe más evidencia de que esta juega un papel importante en la modulación de la respuesta inflamatoria y en las enfermedades como el desarrollo de tumores, siendo el equilibrio entre cepas patógenas, oportunistas y aquellas beneficiosas para el organismo.

Se han realizado estudios que han demostrado que el microbiota intestinal puede cambiar el comportamiento de los roedores enviando al cerebro las señales responsables de regular la insulina. Es decir que influye en los cuadros de obesidad y diabetes.

Algunos de estos microorganismos pueden producir metabolitos específicos, denominados neurotransmisores. Y la presencia o ausencia de estos neurotransmisores podría afectar indirectamente al cerebro y, por ende, influir en el nivel de ansiedad y en el comportamiento.

Los ratones libres de gérmenes (Germ Free) son una herramienta esencial para estudiar la relación que existe entre el microbioma y las enfermedades y para determinar las bases del mecanismo a través del cual los microorganismos influyen en el huésped (Grover y col.2014).

Estos animales también son clave para dilucidar el rol del microbioma en las enfermedades. Por ejemplo, los investigadores comprobaron que las comunidades bacterianas del microbiota intestinal pueden proteger de la obesidad o de las alergias alimentarias, mientras que otros microorganismos pueden provocar inflamación crónica, afecciones autoinmunes, hígado graso y artritis.

Los ratones Libres de Gérmenes se pueden asociar a uno, dos o más microorganismos transformándose en gnotobiotas permitiendo investigar el efecto que estos causan en el organismo.

En síntesis, el uso de los animales libres de gérmenes (GF) o axénicos incluye:

- La identificación de las causas de las enfermedades mediante la comparación de animales GF con convencionales.
- Determinar cómo microbiomas específicos protegen o contribuyen con las enfermedades
- El estudio y descubrimiento de estrategias farmacológicas
- El desarrollo de investigaciones sobre los mecanismos de regulación de los microorganismos en el huésped
- Investigaciones sobre terapéutica y tratamientos en oncología, inmunología, neurociencia y enfermedades infecciosas.

Por lo tanto, es inaceptable utilizar animales infectados en investigaciones, pruebas, ensayos y en docencia, ya que se producen alteraciones fisiológicas y morfológicas. Se generan cambios en el comportamiento de los animales, en la curva de crecimiento, el peso de los órganos, en la reproducción y especialmente en la respuesta inmune. Además de que se alteran los resultados, no se cumple con los estándares de bienestar animal y con las pautas éticas y morales por estar utilizando seres vivos.

Referencias

- Guillén, Javier (2012) FELASA Guidelines and Recommendations. J Am Assoc Lab Anim Sci. May; 51(3): 311–321. Published online 2012 May.
- J. O'Rourke, A. Lee & J. McNeili. (1988) Differences in the gastrointestinal microbiota of specific pathogen free mice: an often-unknown variable in biomedical research *Laboratory Animals* 22, 297-303
- Marion Darnaud, Filipe De Vadder, Pascaline Bogeat, Lilia Boucinha, Anne-Laure Bulteau, AndreiB- unescu, Julie Chaix, Céline Couturier, Ana Delgado, Hélène Dugua, Céline Elie, Alban Mathieu, Djomangan (2019). A standardized gnotobiotic mouse model harboring a minimal 15-member mouse gut microbiota recapitulates SOPF phenotype doi: <https://doi.org/10.1101/12.30.890954>
- M Grover P C Kashyap. (2014) Germ-free mice as a model to study effect of gut microbiota on host physiology. *Neurogastroenterology* Jun; 26(6):745-8 doi: 10.1111/nmo.12366.
- Werner Nicklas, Adrian Deeny, Piet Diercks, Alberto Gobbi, Brunhilde Illgen-Wilcke, Michel Seidelin. (2010) FELASA guidelines for the accreditation of health monitoring programs and testing laboratories involved in health monitoring *Lab Anim (NY)* 39(2): 43-8. doi: 10.1038/labani0210-43