

Edición en español de:  
Laboratory Animals (2009); 43, 311-327

# Laboratory Animals

THE INTERNATIONAL JOURNAL OF  
LABORATORY ANIMAL SCIENCE AND WELFARE

## El impacto de la luz, ruido, limpieza de las cubetas y transporte interno sobre el bienestar y estrés de las ratas de laboratorio

M J Castelhana-Carlos<sup>1</sup> and V Baumans<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Health Sciences, Universidad de Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal; <sup>2</sup>Department of Animals, Science and Society, Division of Laboratory Animal Science, Universidad de Utrecht, Países Bajos.

Este artículo ha sido traducido por: D<sup>a</sup> Clara Martínez Nistal

Revisado por: Dr. José Luís Martín Barrasa

Coordinador: D. Jesús Martínez Palacio

Editado por:



Publicación patrocinada por:



Nuestro agradecimiento al Consejo de Dirección de *Laboratory Animals Ltd.* por el patrocinio y colaboración en esta traducción.

# Artículo de Revisión

## El impacto de la luz, ruido, limpieza de las cubetas y transporte interno sobre el bienestar y estrés de las ratas de laboratorio

M J Castelhana-Carlos<sup>1</sup> and V Baumans<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Health Sciences, Universidad de Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal; <sup>2</sup>Department of Animals, Science and Society, Division of Laboratory Animal Science, Universidad de Utrecht, Países Bajos.

Autor para correspondencia: M J Castelhana-Carlos. Email: [mjoao@ecsau.de.uminho.pt](mailto:mjoao@ecsau.de.uminho.pt)

### Resumen

La interacción humana y los factores ambientales físicos son parte de los estímulos a los que están sometidos a diario los animales de laboratorio, lo que influye en su comportamiento y fisiología y contribuye a su bienestar. Algunas condiciones ambientales y procedimientos rutinarios en el alojamiento del animal pueden inducir respuestas de estrés, y cuando el animal no es capaz de mantener su homeostasis en presencia de un determinado factor estresante, su bienestar se ve amenazado. Este informe resume varios estudios publicados sobre el impacto de factores ambientales tales como luz, ruido, limpieza de las jaulas y transporte interno en el bienestar y estrés de las ratas de laboratorio. Se han analizado las respuestas fisiológicas y de comportamiento de ratas de laboratorio sometidas a condiciones de alojamiento y procedimientos rutinarios diferentes. Se discutirán recomendaciones sobre el bienestar de las ratas de laboratorio y mejoras en el diseño de experimentos y cómo estos pueden influir y mejorar la calidad de datos.

*Laboratory Animals* 2009; 43: 311– 327. DOI: 10.1258/la.2009.0080098

Con el desarrollo de las Ciencias del Animal de Laboratorio y la aplicación del principio de las tres Rs, propuesto por William M S Russell y Rex L Burch en 1959 (reemplazo, reducción y refinamiento)<sup>1</sup> se han desarrollado y aplicado legislaciones y recomendaciones para proteger a los animales utilizados en experimentos. En Europa, se han establecido los principios para el alojamiento y cuidado de los animales de laboratorio en el Convenio Europeo para la protección de animales vertebrados utilizados para experimentación y otros fines científicos (Convenio del Consejo de Europa ETS 123), con su Apéndice A: Pautas para el alojamiento y cuidado de los animales (Consejo de Europa 1986; revisado en 2006, Estrasburgo, <http://conventions.coe.int/Treaty/EN/Treaties/PDF/123-Arev.pdf>), donde se especifica que se debe proveer a todos los animales con un alojamiento y entorno apropiados, al menos un mínimo grado de libertad de movimiento, alimento, agua y cuidados adecuados para su salud y bienestar. Las necesidades fisiológicas y etológicas deben satisfacerse en la medida de lo posible, y deben minimizarse

las restricciones (artículo 5).<sup>2-4</sup> Otro documento europeo que contiene especificaciones sobre el alojamiento de los animales de laboratorio es la recomendación de 2007 de la Comisión Europea referente a Pautas para el alojamiento y cuidados de los animales utilizados para experimentación y otros procedimientos científicos (<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:EN.PDF>).<sup>5</sup>

El bienestar animal puede estar relacionado con su percepción emocional del entorno, con cómo los animales se relacionan con su entorno y cómo compensan los cambios adversos en dicho entorno mediante ajustes fisiológicos y de comportamiento.<sup>3,6</sup> La capacidad de predecir y controlar son conceptos clave a este respecto, pero para un bienestar óptimo, un cierto grado de incertidumbre (impredicibilidad y falta de control) puede tener un gran efecto positivo. En condiciones naturales, los animales están expuestos tanto a estímulos negativos como positivos, y “vivir en armonía con su entorno” probablemente implica que debe ser posible mantener un

equilibrio (positivo) entre estos estímulos.<sup>7,8</sup>

Los animales de laboratorio se mantienen en cautiverio durante toda su vida. En los procedimientos para manejo y cría de los animales, deberían aplicarse el concepto de las cinco libertades (libres de sed, hambre y malnutrición, libres de incomodidad, libres de dolor, daño y enfermedad, libres para expresar comportamientos normales y libres de miedo y angustia), concepto que se introdujo por primera vez referido a los animales de granja en 1965,<sup>9</sup> para asegurar el bienestar de los animales, a menos que esto interfiera con el objeto científico. Se ha argumentado, no obstante, que el fallo del concepto de las cinco libertades es que no es necesario para el bienestar del animal estar en absoluta libertad de hambre, frío, dolor o miedo; tan solo debería ser capaz hacer frente estos problemas de manera efectiva para evitar el sufrimiento.<sup>7</sup>

En lo que respecta al bienestar animal, los factores ambientales tales como el tamaño y estructura de las jaulas, los niveles de NH<sub>3</sub> y CO<sub>2</sub>, la luz (intensidad, longitud de onda, fotoperiodo y frecuencia del parpadeo), los sonidos, el aire/ventilación, la temperatura, la humedad relativa, los olores, la presencia/ausencia de patógenos y la presencia/interacción humanas son tan importantes como la presencia o ausencia de otros animales de la misma especie, su sexo, y si el entorno es predecible y controlable.<sup>4</sup><sup>10,11</sup> La capacidad de adaptación al nuevo entorno depende de la filogenia (morfología específica de la especie, fisiología y comportamiento), y en la historia individual (aprendizaje durante la ontogenia y la edad adulta). Los factores ambientales ponen a prueba el equilibrio biológico del animal al interferir con su homeostasis (experiencias positivas y negativas), y si el animal no es capaz de mantener su homeostasis mediante respuestas fisiológicas y de comportamiento, con el paso del tiempo se desarrollará estrés.<sup>4,7</sup> El estrés puede definirse como la respuesta biológica que tiene lugar cuando un individuo percibe una amenaza (estresor) para su homeostasis, pero cuando el estrés realmente constituye una amenaza para el bienestar del animal, entonces el animal padece sufrimiento ("bad estrés").<sup>12</sup>

La presencia o ausencia de determinados comportamientos naturales (específicos de cada especie) se emplea como indicador del bienestar animal. Por ejemplo, cuando los mamíferos juegan se considera un indicador fiable de su bienestar, ya que una de las características principales de este comportamiento es que no se percibe al estar bajo condiciones estresantes.<sup>7</sup> El comportamiento motivado junto con datos fisiológicos pueden proporcionar un indicador útil de las prioridades animales y de la salud física, y de los efectos del entorno, cría y procedimientos

experimentales que se llevan a cabo en el animal.<sup>3,7</sup>

El entorno de los animales de laboratorio consiste en una amplia gama de estímulos (factores ambientales físicos y sociales mencionados anteriormente) y debería ajustarse a las necesidades fisiológicas y de comportamiento tales como el descanso, la construcción de nidos, el escondite, la exploración, la búsqueda de alimento, el mordisqueo y los contactos sociales.<sup>3</sup> En la práctica, las condiciones ambientales estandarizadas se utilizan para reducir las variaciones entre animales del mismo grupo experimental y entre diferentes estudios, facilitando la detección de efectos del tratamiento y aumentando la reproducibilidad de resultados en distintos laboratorios.<sup>13</sup> No obstante, esta estandarización desarrollada para minimizar los efectos ambientales incontrolados en los animales, puede ser una fuente primaria de efectos patógenos (estresores). La creencia actual es que la estructuración apropiada de la jaula y el entorno podrían ser más beneficiosos que el proveer una gran superficie, aunque es necesaria un área determinada para proporcionar un espacio estructurado. Con excepción de para la actividad motriz (por ejemplo el juego), los animales realmente no utilizan espacio, sino recursos y estructuras dentro del área para comportamientos específicos.<sup>3</sup> La manipulación cuidadosa de los roedores de laboratorio desde una edad temprana, junto con su condicionamiento para procedimientos experimentales y de cría, reducirán con toda probabilidad las respuestas de estrés de forma considerable.<sup>14</sup> Puede conseguirse una sensación de seguridad proporcionando materiales manipulables y adecuados para la construcción de nidos, lugares para esconderse y compañeros de jaula compatibles.<sup>3</sup> Por ejemplo, las ratas son animales sociales y el aislamiento puede tener efectos permanentes en su comportamiento y fisiología. Las ratas, cuando se las cría en un entorno enriquecido con objetos tales como escaleras, pelotas, tubos y cajas, desde el destete, son mejores en varias tareas de aprendizaje, menos defensivas, muestran mayor comportamiento explorador, y presentan una corteza cerebral más desarrollada y mayor densidad sináptica que las ratas criadas en condiciones estándar.<sup>15,16</sup> El enriquecimiento del entorno debería comprender un programa bien diseñado y críticamente evaluado que beneficie al animal así como al resultado del experimento, y debería considerarse como un componente esencial del programa general de cuidados del animal, tan importante como la nutrición y el cuidado veterinario.<sup>3</sup>

Al considerar materiales utilizados como cama de las cubetas, se ha demostrado que las ratas prefieren lechos que puedan manipular, compuestos por partículas grandes adecuadas para su uso como materiales para la

construcción de nidos.<sup>17</sup> Sin embargo, las maderas blandas (cedro rojo, pino canadiense o pino ponderosa) han demostrado causar disminución del tiempo de sueño y la inducción de actividad, tanto en la fracción supernadante como en la microsomal del hígado de las ratas Sprague-Dawley, de enzimas que metabolizan fármacos, cosa que no sucede con la madera de álamo.<sup>18</sup> Un suave procesamiento hidrotermal puede eliminar muchos de los componentes volátiles del aceite esencial de cedro, reduciéndose, por tanto, el efecto inductor de citocromo P450 hepático.<sup>19</sup> Es por lo tanto fundamental tener un conocimiento apropiado de los materiales.

Como se ha mencionado anteriormente, la interacción humana y los factores físicos del entorno son parte de los estímulos a los que se somete a diario a los animales de laboratorio. Los factores ambientales de luz y ruido, junto con la limpieza de las cubetas y el transporte fueron objeto de debate al crear instalaciones donde la mayoría de las ratas se usan para experimentos de comportamiento y estudios sobre el estrés. La luz y el ruido fueron aspectos importantes en los debates con ingenieros a nivel de la estructura física de las instalaciones para el animal y su equipamiento. Las rutinas de las instalaciones animales, tales como la limpieza de jaulas y su transporte a una habitación adyacente, son procedimientos que normalmente no se tienen en cuenta para el diseño experimental, pero que también tienen un efecto en los animales de laboratorio. El presente estudio se centrará en el impacto de la luz, el ruido, la limpieza de las cubetas y el transporte interno en el bienestar y el estrés de la rata de laboratorio, el segundo vertebrado más utilizado en investigación.

## Luz y visión

La luz es un factor ambiental abiótico importante que influye en el comportamiento y la fisiología de los animales de laboratorio. Los efectos de la luz se relacionan con aspectos tales como la intensidad, la longitud de onda y la duración (fotoperiodo). Las ratas son animales nocturnos y están mejor adaptadas a la luz tenue.<sup>10, 11</sup> Inicialmente, los experimentos de comportamiento y electrofisiológicos indicaban que las ratas carecen de visión en color, pero más tarde se ha demostrado, mediante electroretinogramas y pruebas de comportamiento, que las ratas podrían tener visión dicromática en color.<sup>20</sup> La retina de las ratas contiene bastones y conos, pero solo tiene dos clases de conos, uno que contiene un fotopigmento sensible al ultravioleta y otro que contiene un pigmento extremadamente sensible a las longitudes de onda medias del espectro visible.<sup>20, 21</sup> Un sistema tiene su máxima sensibilidad fotópica a una longitud de onda de 510 nm, que desciende rápidamente a longitudes de onda superiores a 560 nm (rojo-infrarrojo), y

el otro mecanismo fotópico tiene su sensibilidad máxima a una longitud de onda de 360 nm, cercano al rango ultravioleta.<sup>11,20,21</sup>

Las variaciones en la intensidad de la luz se darán en el interior de las cubetas de plástico transparente en estantes o baldas, dependiendo de su posición con respecto a la fuente de luz, aunque la variación es menor cuanto más lejos están las jaulas de la fuente de luz.<sup>10</sup> Las ratas son en extremo sensibles a la luz. A menudo se ha dado testimonio de daño de las retinas debido a la exposición a la luz. Las ratas albinas han desarrollado una mayor sensibilidad a la luz intensa, ya que carecen de la pigmentación normal de los ojos.<sup>22-24</sup>

## La luz y el ojo de la rata

Aunque varios factores contribuyen a la hora de determinar en qué medida se daña la retina por influencia de la luz (intensidad y duración de la exposición a la luz; longitud de onda de la luz; edad de la rata, variedad y pigmentación ocular; antecedentes de exposición a la luz del animal), se ha informado de daño de las retinas en ratas albinas a intensidades luminosas superiores a 60 lx.<sup>23, 25, 26</sup> Un sistema de pruebas de preferencia ha demostrado que, aunque el efecto fuese más pronunciado en las ratas albinas, tanto las albinas como las pigmentadas preferían cubetas con una baja intensidad lumínica (<100 lx) por encima de aquellas con una intensidad mayor (100-380 lx).<sup>27</sup> Mediante el uso de pruebas de evasión, Schlingmann et al.<sup>28</sup> han demostrado que las ratas albinas evitan intensidades lumínicas tan bajas como 25 lx, y que las ratas pigmentadas desde 60 lx, pero las habitaciones de los animales deben tener luz suficiente como para que los técnicos puedan llevar a cabo labores de cuidado animal. Los mismos autores han establecido un mínimo de 210 lx como suficiente para la salud y buen desarrollo del trabajo del personal.<sup>29</sup> Por lo tanto es muy recomendable proporcionar a las ratas un espacio para resguardarse del exceso de luz.

Los ciclos de intensidad de luz (12 horas de luz y 12 de oscuridad) bajo los que se cría a las ratas han demostrado tener una influencia en la longitud del segmento exterior de los bastones, la densidad de fotorreceptores, el índice de regeneración de pigmento visual en toda la retina, la concentración de ácidos grasos y colesterol en el segmento exterior de las membranas fotorreceptoras y la capacidad antioxidante de la retina de las ratas. Las retinas de las ratas criadas bajo ciclos de luz de alta intensidad (por ejemplo 400 lx) adquirieron características que las hacían menos susceptibles al daño infligido por la luz cuando se las comparaba con ratas criadas bajo ciclos de luz de baja intensidad (por ejemplo 6 lx). Tales características incluían un número reducido de células fotorreceptoras, longitud

reducida del segmento exterior y concentración reducida de pigmentos, niveles inferiores de ácidos grasos poliinsaturados y mayores capacidades antioxidantes.<sup>23, 30, 31</sup>

El daño de las retinas, inducido por la luz, se desencadena por la decoloración de la rodopsina, y las ratas albinas han demostrado adaptarse a cambios en la intensidad de la luz en el entorno ajustando la cantidad de rodopsina por retina.<sup>32, 33</sup>

Case y Plummer<sup>34</sup> indicaron que la retina adulta responde a entornos con diferente iluminación mediante un cambio, relativamente rápido, en el tamaño de los segmentos fotorreceptores, mediante un gran cambio progresivo en el número de sinapsis y por otro gran cambio progresivo pero más lento en el tamaño de las terminaciones nerviosas fotorreceptoras.

El historial previo de exposición a la luz al que ha sido sometido el animal, también influye en la respuesta de las retinas a la luz. Ratas criadas con luz tenue han demostrado exhibir un aumento, directamente proporcional a la edad, en la susceptibilidad al daño de las retinas originado por la luz, mientras que las ratas criadas en la oscuridad eran susceptibles al daño, independientemente de la edad.<sup>26, 33</sup>

El daño de las retinas ha demostrado ser mayor en ratas expuestas a una dosis de luz intensa durante su periodo nocturno que en ratas expuestas al mismo tratamiento de luz durante su periodo diurno (daño circadiano por luz de la retina).<sup>35</sup> El mecanismo que propicia la susceptibilidad al daño de la retina por luz parece implicar un proceso apoptótico de muerte de las células visuales.<sup>26, 33, 35</sup> Una sola exposición, relativamente corta a luz intensa, puede causar una pérdida de células fotorreceptoras, inducida por oxidación, de forma circadiano-dependiente.<sup>35</sup> De forma ideal, las ratas de laboratorio deberían mantenerse en el mismo ciclo de luz e intensidad durante toda su estancia en el laboratorio con el objeto de evitar los cambios fisiológicos y los daños mencionados anteriormente. Mantener un entorno luminoso estandarizado para los animales contribuiría a su bienestar y a la posibilidad de reproducir los resultados experimentales.

### Luz, comportamiento y fisiología

La actividad y comportamientos animales también se ven influenciados por la intensidad luminosa del entorno. El índice de defecación (PVG/C) en "hooded rats" (ratas bicolor o encapuchadas) puede aumentarse bajo iluminación intensa (proporcionada por una bombilla de 150 W suspendida y centrada en lo alto de un laberinto en forma de "Y" rodeado por una cortina gris de 1,37 x 1,37 x 1,22 m de altura).<sup>10, 36</sup> La luz intensa (572 lx) suprimía los juegos sociales de ratas Wistar Han macho jóvenes, habituadas a condiciones de luz tenue. En los test con luz

intensa, no había signos de luchas o peleas, y las persecuciones habían disminuido de forma significativa.<sup>37</sup> Estos comportamientos de juegos sociales son importantes para el desarrollo (social) de los animales, los cuales aprenderán una tarea para poder tener la oportunidad de jugar. Las ratas prefieren jugar en lugares resguardados,<sup>38</sup> de los que apenas se dispone bajo condiciones de luz intensa.<sup>37</sup> La presencia de objetos de enriquecimiento ambiental que proporcionen cobijo puede, por lo tanto, ser importante, creando áreas con intensidad luminosa reducida dentro de la cubeta y permitiendo que las ratas se escondan.

Es difícil separar los efectos debidos a la intensidad de la luz de los causados por diferentes longitudes de onda, y no se dispone de muchos datos científicos sobre el efecto del color de la luz en animales de laboratorio, lo que en ocasiones también puede ser problemático.<sup>10, 39</sup> Sin embargo, se ha demostrado que la luz roja fluorescente sirve como sincronización para ratas a las que se mantiene a oscuras,<sup>40</sup> incluso con intensidades de luz inferiores a 1 lx.<sup>39, 40</sup> Se ha demostrado que puede alterarse el momento de la ovulación por la luz roja, lo que sugiere que el ritmo circadiano de secreción de hormona luteinizante (LH) podría verse modificado por dicha luz.<sup>40</sup> Sin embargo, la luz de este color sigue usándose como oscuridad (por ejemplo en estudios de comportamiento). Se ha demostrado en ratones, que la actividad motriz voluntaria en las ruedas, está influenciada por luces de diferentes colores.<sup>41</sup> La luz roja podría tener un efecto en el comportamiento y fisiología de los animales, lo que hizo que Wersinger y Martin<sup>42</sup> recomendaran a los investigadores, que llevan a cabo estudios sobre comportamientos sociales, que no den por sentado que los roedores de laboratorio no son capaces de detectar luz roja tenue y que minimicen la exposición de animales a cualquier tipo de luz durante el periodo de oscuridad.

Durante los periodos de luz, la luz fluorescente que normalmente se usa en animalarios, proporciona un rango más limitado de longitudes de onda que la luz solar; por lo tanto, usar bombillas de luz fluorescente de espectro completo podría considerarse una manera de proporcionar un entorno de luz más natural en el laboratorio.

La luz es la señal ambiental más importante para regular el patrón temporal de los comportamientos animales y de su fisiología, ya que regula los ritmos circadianos y estimula y sincroniza los ciclos de reproducción.<sup>10</sup> El núcleo supraquiasmático del hipotálamo (NSQ) contiene el regulador primario del ritmo circadiano en los mamíferos, y la actividad neuronal del NSQ está directamente regulada por la luz ambiental a través del tracto retinohipotalámico (vía pineal/pituitaria/hipotalámica-neuroendocrina, empezando en los fotorreceptores de la retina).<sup>10, 43, 44</sup>

## Ciclos de reproducción

Se ha demostrado que la duración del ciclo estral en las ratas, está afectado por cambios en las proporciones luz:oscuridad (L:O) del ciclo que se utilice.<sup>10</sup> También, el momento de la ovulación y la duración de la gestación en ratas, están afectados por el ciclo L:O bajo el que se cría a los animales.<sup>10,45</sup> Se ha referido, que la exposición nocturna de hembras Sprague-Dawley a luz de intensidad mínima, produce una incidencia sustancial de cambios ováricos, lo que sugiere que la incidencia de atrofia ovárica observada por los autores en un estudio previo podría haber sido debida a una exposición temporal a luz nocturna indirecta de intensidad mínima.<sup>46</sup>

## Ritmos circadianos

Se ha demostrado que la exposición continua a luz intensa, suprime severamente los ritmos circadianos del ciclo actividad-sueño, bebida, movimiento, presión sanguínea, frecuencia cardíaca (RC) y temperatura corporal (TC),<sup>47-49</sup> que están regulados por el NSQ.<sup>43, 50</sup> Se ha demostrado que el alojamiento en condiciones de luz constante (LL) aumenta los niveles de corticosterona en ratas machos y hembras, y se usa como modelo experimental de estrés crónico.<sup>51,52</sup>

Como se mencionaba anteriormente, en ratas adultas, tras una larga exposición a LL, la frecuencia circadiana desaparece, al igual que los ritmos de actividad motriz, TC,<sup>47,53</sup> melatonina plasmática<sup>54</sup> y hormonas sexuales.<sup>55</sup> Sin embargo, si previamente han sido expuestas a LL durante el periodo de lactancia, se ha demostrado que las ratas albinas adultas presentan ritmo circadiano de actividad motriz.<sup>56, 57</sup> Un periodo crítico para la sensibilidad y la capacidad de adaptación a factores externos en ratas, parece estar situado en la mitad del periodo de lactancia.<sup>56</sup> La luz recibida durante la lactancia afecta la intensidad de acción del regulador circadiano y su sensibilidad a la luz.<sup>58</sup> Las condiciones de iluminación a las que están expuestos los animales recién nacidos son de gran importancia, ya que afectarán el sistema circadiano y condicionarán la adaptación posterior del animal adulto a las condiciones externas en las que viva.

También se ha demostrado que la duración de los periodos en el ciclo luz/oscuridad bajo el que se mantiene a las ratas influye sobre el peso corporal y el consumo de alimentos en machos jóvenes de rata Wistar.<sup>59</sup> Un cambio en el ciclo de luz (reduciendo el fotoperiodo o cambiando la horas de encendido y apagado de luces) induce un cambio en los ritmos circadianos de presión sanguínea, RC, y actividad motriz espontánea en ratas con libertad de

movimiento, que puede tardar hasta una semana en sincronizarse totalmente con el nuevo fotoperiodo.<sup>60,61</sup>

Ratas Sprague Dawley y ratas espontáneamente hipertensas alojadas en cubetas individuales, a las que se implantó un transmisor radiotelemétrico presentaban disminución de la RC basal al alojarlas bajo iluminación de 10 lx o en un fotoperiodo L:O de 8:16 horas con una iluminación de 200 lx, en comparación con las alojadas bajo un ciclo de luz de 12:12 con una iluminación de 2000 lx. Aunque el patrón de efectos fue diferente según la variedad y sexo de las ratas, Azar et al.<sup>62</sup> concluyeron que alojar ratas bajo 12:12 horas L:O y luz ambiental de 200 lx era potencialmente estresante. La adaptación de las ratas a la reducción del fotoperiodo parece mejor cuando se amplía la oscuridad de forma simétrica al amanecer y al atardecer.<sup>60</sup> Puede estar recomendado el uso de sistemas que hagan que la luz sea más tenue en las habitaciones para ratas con el objeto de simular el anochecer entre los ciclos de luz y oscuridad<sup>63</sup>, aunque no se dispone de mucha información que compare los cambios fisiológicos y de comportamiento en las ratas tras el apagado inmediato de las luces comparado con la transición gradual de la luz a la oscuridad y viceversa. El uso de temporizadores que proporcionasen una transición gradual imitarían mejor la luz natural al amanecer y anochecer, lo que se ha sugerido como preferible para estudios sobre el comportamiento social de especies crepusculares.<sup>42</sup>

La efectividad de los estímulos luminosos en las alteraciones del reloj circadiano diurno puede modificarse mediante el aprendizaje y acontecimientos en el entorno que de manera fiable predicen la aparición de la luz.<sup>64</sup> Los estímulos luminosos pueden adquirir un significado negativo al acompañarse de forma sistemática de acontecimientos adversos, y por lo tanto no lograr proporcionar los estímulos óptimos para relacionar los ritmos circadianos.<sup>65</sup>

En resumen, la luz ambiental es un factor fundamental con un impacto importante en la fisiología y comportamiento de la rata de laboratorio, y debería ser un factor bien controlado a la hora de establecer las condiciones de alojamiento. El fotoperiodo debería ser estable para contribuir tanto al bienestar del animal (por ejemplo, evitando la angustia, alteraciones del comportamiento, daño de las retinas y supresión de los ritmos circadianos) como a unos buenos resultados experimentales. Las ratas albinas evitan áreas con niveles de luz superiores a 25 lx, y tal y como recomiendan las guías de trabajo europeas (Convención Europea para la protección de animales vertebrados utilizados para experimentación y otros fines científicos: Apéndice A, Convención del Consejo de Europa ETS 123), el alojamiento del animal

debería estar sometido a una intensidad de luz baja (suficiente para llevar a cabo los procedimientos de reproducción e inspección de los animales,<sup>2</sup> por ejemplo cerca de 210 lx a la altura de trabajo) y deberían proporcionarse áreas más oscuras o escondites dentro de las jaulas (por ejemplo tubos o refugios para proporcionar a las ratas algo de control con respecto a su exposición a la luz). Las jaulas que se encuentren en los estantes más altos podrían estar expuestas a demasiada luz, y deben recibir especial atención.

### **Sonido, audición y vocalización**

Los efectos del sonido sobre la fisiología y comportamiento animal dependen no solo de su intensidad (o volumen), medida en decibelios (dB); su frecuencia, medida en hercios (Hz); y su duración y patrón (incluyendo el potencial de vibración), sino también de la capacidad auditiva de la especie y cepa del animal, la edad y estado fisiológico en el momento de la exposición, sonidos a los que haya estado expuesto el animal durante su vida (antecedentes de exposición al ruido del animal) y a la capacidad de predecir los estímulos acústicos.<sup>10, 66-69</sup> Los sonidos con significado a unos niveles de intensidad relativamente bajos pueden tener un efecto considerable en la fisiología y comportamiento del animal al implicar el sistema límbico y centros superiores implicados en la determinación del contexto y significado.<sup>68</sup>

### **Sensibilidad auditiva**

Los roedores tienen un espectro de sonidos audibles diferente, con sensibilidad máxima para frecuencias que son inaudibles para los humanos. Los humanos perciben frecuencias de entre 20 y 20.000 Hz, de las cuales, las importantes para el habla están entre 400 y 4.800 Hz. Los roedores no solo producen sonidos que podemos oír, sino que también pueden escuchar y producir sonidos con frecuencias inaudibles para los humanos (por encima de 20kHz), percibiendo sonidos de hasta 80 kHz.<sup>68, 70-72</sup> Se han empleado diferentes métodos para determinar el rango auditivo de los animales de laboratorio, y los resultados presentados en la literatura al respecto son muy variados.<sup>66, 71, 73</sup> Mediante el uso de una combinación entre condicionamiento operante y el método psicofísico del estímulo constante, Gourevitch y Hack determinaron que región de frecuencia de mayor sensibilidad auditiva para la rata, aproximadamente 1 octava de amplitud, está localizada cerca de los 40 Hz (frecuencia a la que la rata es más sensible). En este estudio, se entrenaba a ratas Wistar, privadas de agua, a responder a un tono presionando una

barra para obtener agua como recompensa (condicionamiento operante). El método de estímulos constantes se aplicó variando al azar la intensidad de la señal de presentación a presentación, entre cinco intensidades seleccionadas en base a mediciones previas, de modo que la señal más fuerte era casi siempre audible para la rata y la señal más débil era raramente audible.<sup>74</sup> Kelly y Masterton refirieron un rango auditivo de 250 Hz a 80 kHz a 70 dB (SPL) para ratas albinas (Sprague-Dawley) mediante el uso de la técnica de supresión condicionada: primero, se privaba de agua a los animales en su jaula, y después se les entrenaba para lamer una tetina de agua, como refuerzo, en el sistema diseñado para la prueba; posteriormente, se entrenaba a los animales a asociar un tono de 10 segundos con una descarga en la pata, hasta que el tono proporcionaba una respuesta paralizante que impedía lamer el agua: esta parálisis o imposibilidad para lamer era entonces utilizada como indicador de la capacidad del animal para oír un tono. Las pruebas de comportamiento han determinado que la sensibilidad auditiva absoluta de la rata es inferior a 10 dB SPL a 38 kHz.<sup>72</sup> Mediante el uso de técnicas de comportamiento y electrofisiológicas, Borg<sup>75</sup> estableció que el grado más alto de sensibilidad auditiva absoluta de las ratas albinas está en torno a 12-24 kHz, siendo el límite auditivo más alto 50 kHz. El audiograma de comportamiento de la rata Norway encapuchada (hooded rat) estaba determinado por frecuencias de 250 Hz a 70 kHz. A un nivel de 60 dB SPL, los límites de baja frecuencia son 530 Hz para las ratas encapuchadas y 400 Hz para las albinas. En el otro extremo, los límites de alta frecuencia son de 68 kHz para las ratas encapuchadas, con una estimación de 76 kHz para las albinas. Heffner et al.<sup>76</sup> no detectaron efectos del albinismo, ya que no había diferencias en los audiogramas entre ratas Norway albinas o pigmentadas (*Rattus norvegicus*). El audiograma de las ratas, comparado con el de los humanos, se caracteriza por una baja capacidad para detectar frecuencias bajas (inferiores a 500 Hz) y una mejor capacidad para detectar frecuencias elevadas (por encima de 8.000 Hz).<sup>68</sup>

Existen diferencias en la estructura de los distintos tipos celulares en el oído interno entre *R. norvegicus* pigmentadas y albinas. También se han relacionado las diferencias en la sensibilidad auditiva con las diferencias de edad, cepa y origen.<sup>67, 68, 71, 76, 77</sup> Por ejemplo, la rata de la cepa Fisher 344 (F344) presenta una sensibilidad auditiva muy diferente comparada con el cruce híbrido F1 entre la F344 y la rata Brown Norway (FBN). Las ratas F344 muestran aproximadamente 20 dB superiores de audición a bajas frecuencias (4 kHz), mientras que las ratas FBN muestran aproximadamente 20 dB superiores de audición a altas frecuencias (32 kHz).<sup>68</sup> También se han registrado

diferencias de edad en la capacidad auditiva de las ratas; se ha detectado que las primeras respuestas auditivas a través de los nervios y el bulbo raquídeo comienzan en crías de rata de 7-8 días de edad. La sensibilidad auditiva de las ratas aumenta con la apertura del conducto auditivo a los 12-14 días de edad y alcanza umbrales adultos alrededor de los 20-22 días.<sup>67,78</sup> Se ha demostrado que el oído interno de las crías de rata posee una susceptibilidad máxima al trauma acústico a los 22 días de edad, tras la exposición continua a ruido blanco (ruido cuya energía sonora se incrementa 3dB al aumentar una octava) de 120 dB SPL durante 30 minutos.<sup>79</sup>

<sup>80</sup> La privación auditiva también puede tener importantes efectos en la capacidad auditiva del animal. Algunos estudios han sugerido que existe un periodo sensible, entre los días 10 y 16 posteriores al nacimiento (incluyendo la apertura del conducto auditivo), durante el cual, el desarrollo adecuado de algunas partes del sistema auditivo de la rata (concretamente los núcleos cocleares dorsal y ventral) podría requerir estimulación acústica.<sup>81</sup> Poon y Chen<sup>82</sup> demostraron que la exposición a series de tonos mejoraba la capacidad de los animales para procesar dichos tonos.

### Vocalización/comunicación

Como sabemos, las ratas no solo reaccionan a sonidos, sino que también los transmiten. La emisión de ultrasonidos es una vía de comunicación importante utilizada por las ratas en diversas situaciones, pero también pueden vocalizar por debajo de 20 kHz. Se han detectado ultrasonidos durante interacciones agresivas, relaciones sexuales, cuidados maternos y durante situaciones estresantes (por ejemplo manipulación, dolor o presencia de un depredador), y se detectaron vocalizaciones por debajo de 20 kHz en interacciones agresivas, durante los primeros días de vida o al sentir dolor.<sup>66,67,69,83</sup>

La mayoría de los ultrasonidos se emiten a una frecuencia de 21-32 kHz y de este modo, se denominan llamadas de 22 kHz.<sup>67, 84</sup> Sales<sup>85</sup> ha descrito las dos principales vocalizaciones ultrasónicas durante interacciones agresivas entre machos: una señal corta entre 40 y 70 kHz y una larga entre 23 y 30 kHz. Al observar el comportamiento de las ratas, Sales propuso que las vocalizaciones largas indicaban comportamiento sumiso (por parte del intruso), mientras que las cortas representaban agresividad por parte del macho residente. Algunos estudios dan testimonio de llamadas de 22 kHz asociadas con una disminución en la respuesta al comportamiento agresivo de la rata residente y de la inhibición del ataque, pero en otros estudios se ha encontrado que la rata sumisa emitía tanto llamadas largas (22 kHz) como cortas (50 kHz) y algunos

grupos no han podido encontrar una correlación entre la inhibición de comportamiento agresivo y la vocalización ultrasónica.<sup>67,85</sup> También se ha demostrado que las hembras de rata emiten llamadas ultrasónicas tanto de alta (32-60 kHz) como de baja frecuencia (20-32 kHz) durante encuentros con machos, aumentando el índice de llamadas de alta frecuencia durante el estro. Se demostró que los ultrasonidos de baja frecuencia eran más cortos en duración y más altos en frecuencia en relación con los emitidos por los machos en condiciones similares.<sup>86</sup>

Grupos de tres machos y dos hembras de ratas Long-Evans, alojadas en un sistema de madriguera visible, mostraron niveles altos de gritos ultrasónicos de 18-24 kHz cuando se les ponía en presencia de un gato (depredador). Estos gritos fueron emitidos tanto durante la presentación del gato como en los 30 minutos posteriores a la retirada del mismo, momento en que las ratas preferían “escondarse” en el sistema de túneles. En el mismo estudio, cuando se confrontaron a ratas, alojadas de forma individual, con el gato, con o sin un lugar donde esconderse, no se detectaron apenas vocalizaciones. Blanchard et al.<sup>83</sup> sugirió que la emisión de vocalizaciones ultrasónicas durante y después de la exposición a un depredador están en gran parte facilitadas por la presencia de otros animales familiares, y podrían servir como gritos de alerta.

Tanto los machos como las hembras emiten ultrasonidos durante la cópula. Se determinó que las llamadas sexuales ultrasónicas estaban divididas en llamadas de 22 y 50 kHz. Las de 22 kHz se emiten antes y después de la eyaculación.<sup>87, 88</sup> Barfield y Geyer<sup>87</sup> describieron las llamadas de las ratas macho como pulsos regulares de 1-3 segundos de duración, 22-23 kHz de frecuencia y una intensidad que puede aumentar hasta 80 dB. Se ha demostrado que las hembras producen vocalizaciones cortas (10-200 ms) de 40-70 kHz durante la cópula.<sup>67</sup> Las hembras de rata emiten diferentes ultrasonidos durante todo el ciclo estral. Como respuesta a un macho sexualmente experimentado y desvocalizado, se demostró que el marcaje por olor y las llamadas de apareamiento ultrasónicas de 50 kHz, en hembras de rata Long-Evans, cambiaban de frecuencia a lo largo del ciclo, siendo ambos comportamientos más manifiestos durante el proestro y primeras fases del estro, lo que podría indicar que la vocalización es un factor importante para coordinar la reproducción.<sup>89</sup> También se ha sugerido que las llamadas del macho de 22 kHz anteriores a la eyaculación también son importantes para evitar el comportamiento antagónico de las hembras y para estimular su respuesta sexual.<sup>90</sup>

Las hembras preñadas emiten más ultrasonidos que las que no lo están, y se ha establecido una variación diurna para ambas, durante la cual se emiten más sonidos en



la oscuridad que en las horas de luz.<sup>91</sup> La relación madre-cría implica la emisión de sonidos, desde lo audible a los ultrasonidos. Las crías emiten llamadas ultrasónicas de angustia en respuesta al frío, aislamiento o estimulación táctil inusual.<sup>67</sup> Las llamadas son emitidas por crías de rata cuando la madre las manipula o traslada. La manipulación táctil inusual también puede producir vocalización. Durante la manipulación, la llamada de las crías es audible desde el día 2 en adelante, evolucionando más tarde tanto a la emisión de sonidos audibles como ultrasonidos, y el día 10 solo de ultrasonidos.<sup>92</sup>

Cuando analizaron la respuesta de las ratas a dos tipos de vocalización ultrasónica (50 y 22 kHz) en un test de escondite/aparición, Burman et al.<sup>93</sup> sugirieron que las ratas utilizan vocalizaciones ultrasónicas diferentes para indicar un estado emocional positivo (50 kHz) o negativo (22 kHz). Las ratas que recibieron una respuesta a las vocalizaciones de 22 kHz mostraron una mayor reticencia a salir y pasaron menos tiempo total en el espacio descubierto que aquellas que recibieron repeticiones de ruido de fondo, lo que sugiere un estado de mayor ansiedad, por lo tanto, los autores sugirieron que la vocalización de 22 kHz pueden inducir un estado emocional negativo en las ratas que lo escuchan, y podría, por lo tanto, ser útil como indicador de bienestar para ratas alojadas en grupo.<sup>93</sup>

Debido a su corta longitud de onda, el ultrasonido no puede penetrar bien barreras físicas y no traspasa una cubeta de plástico estándar, lo que podría proteger a los roedores de los ultrasonidos ambientales (dependiendo de la estructura de la cubeta), excepto durante el cambio de las mismas u otros procedimientos que impliquen abrir la cubeta.<sup>42</sup>

También se ha estudiado la emisión de sonidos por ratas bajo situaciones estresantes. Por ejemplo, la manipulación ordinaria de las ratas motiva tanto llamadas audibles como ultrasónicas.<sup>67,94</sup> Las llamadas ultrasónicas se detectaron cuando los machos fueron acariciados con suavidad en la cabeza, cuello, costados del tronco o cola (recibiéndose la mayor reacción al manipular la parte dorsal del cuello y siendo la cola la parte menos sensible).<sup>67,94</sup> La respuesta a la manipulación humana consistía en múltiples series de largas llamadas de 22 kHz. Se demostró que el número de vocalizaciones ultrasónicas (de entre 21 y 32 kHz) de ratas Wistar Han, en respuesta al contacto con la mano, estaba significativamente influenciado por su régimen de alojamiento (individual frente a agrupados). Solo el 60 % de las ratas alojadas en grupo emitió ultrasonidos durante la primera sesión de breve contacto con manos, comparado con el 100 % de las ratas alojadas individualmente. De una sesión a otra, las ratas se acostumbraban con rapidez, hasta la desaparición de la respuesta. Brudzynski y Ociepa<sup>94</sup> sugirieron que esta rápida

adaptación indica que la respuesta de angustia (vocalización ultrasónica de las ratas) podría estar causada por un peligro o amenaza potencial para el animal, y que no refleja necesariamente incomodidad o dolor físicos. También se han registrado en la literatura al respecto las vocalizaciones inducidas por el dolor. Por ejemplo, la estimulación eléctrica de la cola o las patas devolvía vocalizaciones tanto audibles como ultrasónicas a 20-35 kHz.<sup>95,96</sup> Se comprobó que los estímulos acústicos, que inducen una respuesta de alarma, también producen vocalizaciones ultrasónicas en la rata. Los estímulos acústicos que generan alarma produjeron llamadas ultrasónicas continuas, emitiendo largas vocalizaciones (0,5-1,2 s) ultrasónicas (22 kHz) el 50-70 % en los machos de Wistar. Al comparar el desarrollo de vocalización de esta rata con el comportamiento de parálisis, en experimentos de condicionamiento del miedo, Kaltwasser<sup>97</sup> concluyó que los estímulos que generan alarma podrían inducir un estado de miedo en la rata.

## Efectos auditivos del sonido

Al considerar las influencias del ruido en la fisiología y comportamiento de los animales de laboratorio, se han referido y revisado en literatura tanto efectos auditivos (daño en el oído) como no auditivos.<sup>66, 67, 69, 70, 98, 99</sup> La exposición a ruido intenso puede dañar la cóclea y el oído interno y ocasionar una cascada de efectos auditivos a lo largo de todo el sistema auditivo central. La susceptibilidad a la pérdida de audición inducida por el ruido depende de la especie y cepa, y ha demostrado estar genéticamente determinada en cepas de ratones consanguíneos.<sup>68</sup> La exposición a patrones de estímulos uniformes puede llevar, con mayor probabilidad, a la pérdida auditiva, mientras que la exposición a patrones irregulares puede causar problemas debidos a la activación del sistema neuroendocrino.<sup>98</sup> Como se mencionó anteriormente, las crías de rata son más sensibles al daño auditivo antes de los 22 días de vida, durante el periodo de diferenciación de las estructuras del oído.<sup>80</sup> También se ha informado del deterioro de la función auditiva relacionada con la edad en ratas, no solo como una consecuencia natural de la edad, sino también como resultado de estímulos de ruido.<sup>100,101</sup> Se ha referido pérdidas de audición en ratas de edades entre 20-25 meses, originándose la mayor pérdida de la que se tiene constancia con rangos de frecuencia entre 24 y 40 kHz.<sup>67, 77, 101</sup> El ruido ambiental constante también puede tener consecuencias negativas para el desarrollo normal del sistema auditivo de los animales al enmascarar las vocalizaciones y otras fuentes de sonido.<sup>68</sup>

Las convulsiones audiogénicas también pueden ser otro posible efecto del sonido. Un animal con estos

trastornos ocasionados por el sonido puede agazaparse, temblar y cambiar su comportamiento (por ejemplo, en el aseo) después de un estímulo auditivo. Este estado es inmediatamente seguido por carreras incontroladas y convulsiones que implican episodios tónicos y clónicos.<sup>102</sup> Estos ataques pueden dar lugar a efectos estresantes en las ratas. D'Amour et al. demostraron que la inducción de múltiples convulsiones (15-20 en un día) tenían efectos en la fisiología de la rata, produciendo un aumento en el peso de las glándulas adrenales en relación con el peso corporal. Esto no sucedía con la inducción de una única convulsión.<sup>103</sup> En un estudio llevado a cabo por Duncan, se pesaron y analizaron en busca de ácido ascórbico, colesterol y corticosteroides las adrenales de ratas albinas sacrificadas después de convulsiones provocadas una o varias veces al día. Se hallaron hipertrofia adrenal y un aumento de los corticosteroides en respuesta a estrés recurrente, y descensos en el colesterol y ácido ascórbico y aumento en corticosteroides como respuesta aguda a estrés audiogénico.<sup>104</sup> Se ha demostrado que las "convulsiones hiperbáricas del oxígeno" de las ratas, están causados por el volumen del silbido producido por el oxígeno al entrar en la cámara donde estaban alojados los animales, combinado con la poca cuidadosa manipulación de los mismos, siendo por lo tanto una consecuencia de estrés por ruido y manipulación.<sup>105</sup> Hay diferencias en cuanto a la susceptibilidad a los convulsiones audiogénicas entre diferentes cepas de roedores (susceptibilidad genéticamente determinada), pero cepas no susceptibles pueden hacerse susceptibles mediante la exposición a estímulos particulares durante un periodo crítico del desarrollo postnatal. Se demostró que someter a ratas Long-Evans a ruido intenso durante el desarrollo postnatal subsecuente a la función auditiva, generaba susceptibilidad a las convulsiones. Se expuso a las ratas a tonos de 125 dB SPL 10 Hz con 14-36 días y se probó con ruido blanco a los 14 o 19 días siguientes a la exposición. Todas las combinaciones ocasionaron susceptibilidad. Todos los sujetos mostraron clonus a intensidades de 120 dB, aunque algunos comportamientos convulsivos podían mostrarse a 100 dB. La prueba repetida de 120 dB incrementaba la latencia y duración de clonus, y la duración total de las carreras.<sup>106</sup>

### Efectos no-auditivos del sonido

En la literatura se describen varios efectos no auditivos del ruido. El nivel de ruido en laboratorios puede ser suficiente para actuar como agente estresante. El ruido activa la división simpática del sistema nervioso autónomo, produciendo una respuesta de estrés con características

fisiológicas similares a aquellas desencadenadas por otros estímulos sensitivos.<sup>68</sup> El ruido intenso puede causar alteraciones en los sistemas gastrointestinal, inmunológico, reproductivo, nervioso y cardiovascular, en el número de células sanguíneas, así como cambios en el desarrollo, niveles hormonales, estructura adrenal, metabolismo, peso de los órganos, ingesta de alimento, peso corporal y comportamiento. Varios autores han informado de estos descubrimientos y los han revisado.<sup>10, 66-68, 70, 98, 99</sup> A continuación se presentan algunos ejemplos de efectos no-auditivos del ruido en ratas de laboratorio.

Se demostró un descenso en el aumento de peso e ingesta de alimentos en ratas macho Wistar sometidas a estrés por ruido (15 minutos de exposición diaria a un tono de 2640 Hz, 30 W).<sup>107</sup> Las ratas Wistar expuestas, en una cámara acústica, a 1,5 horas/día, de ruido blanco a intensidades de 107-112 dB mostraron pesos de glándulas adrenales aumentados, al compararlas con los animales control sometidos a 60 dB (nivel de ruido de fondo). Las ratas expuestas a ruido de alta intensidad habían aumentado sus niveles totales de leucocitos y una eosinopenia relativa. Durante los seis días de exposición al ruido, las ratas ganaron un 15 % menos de peso que las de control.<sup>108</sup> Se ha informado de un aumento en la vasoconstricción y el RC como efectos no auditivos del sonido en ratas (revisado en Turner et al.<sup>68</sup>). Morseth et al. Mostraron un aumento en la presión sanguínea en hembras de rata normotensas expuestas a diario a ruido blanco (a 67-124 dB) durante 8 horas, durante un periodo de dos semanas. Sin embargo, no se percibió ningún cambio en la presión sanguínea después de la exposición de 10 h al día de sonido de entre 85 y 105 dB, durante toda la vida (más de 2 años), lo que podría ser una consecuencia de la adaptación.<sup>67,68,110</sup>

Muchos estudios han mostrado niveles alterados de hormonas en respuesta a la exposición al ruido. Por ejemplo, aumentos en los niveles de norepinefrina, colesterol y corticosterona. El aumento en los niveles de hormonas del estrés sugiere una activación inducida por el ruido del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (eje HPA), lo que podría causar varios problemas relacionados con niveles anormalmente altos de hormonas circulantes del estrés.<sup>68</sup> Armario et al. estudiaron los efectos del ruido agudo y crónico en los niveles de suero de hormonas hipofisiarias en machos de rata Wistar. Encontraron que los estímulos de ruido agudo aumentaban los niveles de corticosterona, prolactina y LH en suero, y que disminuía la hormona de crecimiento (HC), mientras que la hormona folículo estimulante no se veía afectada por este agente estresante. El ruido crónico no modificaba los niveles basales de ninguna hormona estudiada; sin embargo, la respuesta de algunas hormonas al mismo estímulo se veía alterada: se observaron

respuestas reducidas al sonido de corticosterona, prolactina y HC después de la exposición crónica previa a ese estímulo.<sup>111</sup> Se halló que los niveles de testosterona circulante habían aumentado en ratas Wistar sometidas a ruido agudo (1 h, 85 dB).<sup>112</sup> También se observó una rápida duplicación de los niveles de corticosterona en plasma (que duraron 2-4 h) como resultado de golpear las jaulas metálicas.<sup>113</sup> Más recientemente, Burow et al. mostraron un aumento dependiente de la intensidad del ruido en la hormona adenocorticotrofina y corticosterona plasmática (productos del eje HPA) en ratas Sprague-Dawley en respuesta a la percepción de la amenaza de ruido a volumen elevado, con niveles que empezaban a aumentar a aproximadamente 85 dB (a). En este estudio, se exponía a las ratas al ruido durante 30 minutos, pasando de 80 dB (A) a 110 dB (A) (SPL) en incrementos de 5 dB (A). La inducción de c-fos mRNA (un marcador de la actividad cerebral regional) era muy baja en los cerebros control y los grupos de 80 dB (A), pero varias regiones cerebrales presentaban una inducción de este marcador relacionada con la intensidad.<sup>114</sup>

La función reproductiva de las ratas también puede verse afectada por el sonido. Zondek<sup>115</sup> demostró que la exposición de ratas a ultrasonidos de 50-80 kHz a 80-90 dB durante los cuatro días que dura el periodo de apareamiento, reducía la fertilidad en el 73,2 % y la productividad en un 84 %. La exposición a 100 dB de 3-12 kHz durante un minuto durante los cuatro días de cópula reducía la fertilidad en un 70-80 %.

También se ha informado de problemas del sueño inducidos por ruido ambiental. Los cambios en los patrones de sueño fueron detectados en ratas Long-Evans pigmentadas después de exposición crónica a ruido ambiental (similar a ruido de tráfico y trenes: con una amplitud de una octava de entre 20 y 3000 Hz) compuesto de un ruido de fondo de 70 dB y de varios ruidos impredecibles de una intensidad media de 88 dB. Una exposición crónica a este ruido ambiental (9 días) restringió las cantidades de sueño de ondas lentas (SOL) y sueño paradójico (o REM) y fragmentó estas dos etapas de sueño sin efecto de adaptación. Rabat et al.<sup>116, 117</sup> también hallaron pruebas para la existencia de subpoblaciones de ratas que son resistentes o vulnerables a estos efectos del ruido ambiental y especialmente en lo que concierne a cantidades de SOL, número de episodios y duración de los mismos.

Un ejemplo de interferencia del sonido con el metabolismo fue el demostrado por Friedman et al.,<sup>118</sup> quienes hallaron que los niveles de lípidos (triglicéridos) en el plasma eran el doble en ratas a las que se les había administrado alimentos ricos en grasas durante un ruido blanco continuo de 102 dB con un segundo ruido

intermitente de 114 dB y 200 Hz.

También se ha demostrado que la exposición al ruido a volumen elevado tiene efectos celulares. Por ejemplo, se han dado casos de alteraciones ultraestructurales en el miocardio<sup>119</sup> y glándulas adrenales<sup>120</sup> de ratas Wistar expuestas a ruido con volumen elevado (100 dB) durante 12 h. Se demostró que estos cambios afectaban principalmente a las mitocondrias y a los retículos endoplasmáticos. Se demostró también, que el daño del ADN en los orgánulos mencionados estaba relacionado con esta exposición a altos volúmenes.<sup>119-121</sup> Las alteraciones del miocardio estaban relacionadas con el aumento de los niveles y utilización in situ de noradrenalina.<sup>119</sup>

Se ha demostrado la influencia de diferentes niveles de ruido de fondo en el aprendizaje y comportamiento de las ratas.

En un estudio que empleaba ratas no consanguíneas Wistar, y en el que se probaban diferentes sonidos, Voipio demostró que las respuestas en el comportamiento dependen del tipo de sonido. El ruido causa reacciones de miedo, tales como alarma, huida y parálisis, incluso a niveles bajos. Las ondas sonoras, a SPL bajos, inducen al movimiento o a ninguna respuesta, pero a SPL altos causan efectos más evidentes.<sup>67</sup>

Se ha demostrado una disminución en la actividad motriz de las ratas en respuesta a llamadas naturales de 22 kHz y también a señales artificiales de 38 kHz, durante y después de la exposición a ultrasonidos. Estas ratas Wistar fueron expuestas 5 minutos a sonidos no estimulantes (sonido de fondo correspondiente al sonido de una cinta de radiocasset) seguidos de 5 minutos de señales estimulantes (más ruido, señales de 38 kHz o llamadas de 22 kHz) y por último otros 5 minutos de ruido de fondo. El SPL de cada una de las señales ultrasónicas se ajustó en aproximadamente 65 dB, similar a los niveles de las llamadas de 22 kHz procedente de grabaciones de ratas vencidas. Las llamadas naturales también hacían que olisquearan menos el altavoz comparado con los momentos en los que solo se emitía por el altavoz el ruido de fondo de la cinta. Sales sugirió que esto se debía probablemente a que los animales ya habían experimentado estas llamadas de 22 kHz en su contexto social, en sus cubetas, y podrían haber aprendido a responder a ellas con actividad reducida. Las llamadas emitidas por otras ratas alojadas en el mismo recinto, durante el transporte del grupo o en la sala de experimentación, podrían alterar el comportamiento de otras ratas que pudieran oír las.<sup>122</sup>

En estudios de comportamiento en campo abierto, se ha demostrado que el ruido blanco continuo de 85 dB aumentaba la defecación y reducía tanto las actividades sociales como las no sociales (por ejemplo olisquear,

acicalarse o agazaparse) en machos de rata Sprague-Dawley en comparación con 50, 65 o 75 dB. Tal y como sugieren Weyers et al.,<sup>123</sup> los cambios en las actividades sociales y la defecación pueden interpretarse como reacciones de ansiedad.

En un estudio reciente, ratas genéticamente definidas (cepa consanguínea DA) fueron sometidas a un complicado laberinto con ruido de intensidad moderada (70 dB) o en un entorno silencioso (35 dB). Las ratas expuestas al ruido cometieron menos errores, exploraron menos y terminaron antes su entrenamiento. Estudios anteriores han demostrado que el ruido de volumen intenso, como el utilizado en este estudio, aumenta la captación de colina en varias regiones cerebrales incluyendo la corteza prefrontal y el hipocampo.<sup>124</sup> Por lo tanto los efectos producidos por el ruido podrían deberse al aumento de la actividad colinérgica.<sup>125</sup> Es por ello, que el entorno acústico es un factor que necesita controlarse en estudios de aprendizaje y memoria con modelos animales.

Los animales son capaces de adaptarse al sonido. Se ha demostrado que ratas no consanguíneas de la cepa Wistar, se adaptan a sonidos tras estímulos repetidos. Durante el periodo de exposición a diferentes sonidos (16 días: 4 días con exposición a diferentes sonidos de 60 dB SPL; 2 días de pausa; 4 días con exposición a diferentes sonidos de 80 dB SPL; 2 días de pausa y 2 días con exposición a gritos de rata a 60 dB + 2 días con exposición a gritos de rata a 80 dB), el periodo de adaptación a sonidos menos perjudiciales fue corto, pero los sonidos más perjudiciales causaron una respuesta intensa y habituarse llevó más tiempo. Además, se mencionó que la "memoria" de adaptación era breve y que tipos similares de sonido causaban respuestas similares, incluso al día siguiente.<sup>67</sup>

## Ruido en los animalarios

Se han publicado numerosos estudios que dan cuenta de los diferentes sonidos que pueden producirse en el interior de los animalarios, donde el ruido ambiental es virtualmente inevitable. Las fuentes de sonido pueden ser aparatos (como aires acondicionados, sistemas de ventilación, monitores de vídeo, equipos de laboratorio o alarmas de incendios); procedimientos de mantenimiento que se llevan a cabo de forma rutinaria (tal y como abrir y cerrar puertas, cambiar y lavar cubetas, ruidos de carros, conversaciones entre los trabajadores e incluso frotamiento de tejidos al moverse y arrugado de papeles); y los mismos animales al moverse (por ejemplo al trepar y mordisquear las cubetas y accesorios) y vocalizar (como se ha mencionado previamente).<sup>42, 68, 98, 99, 126-130</sup> Por ejemplo, al analizar los sonidos asociados con el equipamiento que se utiliza en las

instalaciones para animales, Sales et al. grabaron SPL de 56 dB (a 1 m de distancia) y 70 dB (a 0,1 m de distancia) en un rango de alta frecuencia en dos ordenadores estudiados. El monitor del ordenador parecía ser la fuente de la mayoría del sonido (espectro de 10-100 kHz que mostraba picos pronunciados regulares a frecuencias mayores de 15 kHz).<sup>128</sup> Se ha comprobado que la frecuencia constante y ultrasonidos constantes producidos por osciloscopios (28 kHz con un SPL medio de 48 dB a 1 m) y por las pantallas de vídeo de los aparatos y equipos habituales (que producían una serie armónica de frecuencias sonoras desde 16 hasta 160 kHz, con un SPL medio de alrededor de 60 dB a 0,5 m) reduce la actividad total de los machos de rata en el campo abierto. En este estudio, se midió el sonido de grifos abiertos en un lavabo, siendo caracterizados como un complejo sonido de ruido constante con breves apariciones de sonido en una frecuencia de hasta 160 kHz con un SPL medio máximo de 95 dB.<sup>127</sup> Estos son ejemplos de ultrasonidos que pueden producirse en las instalaciones del animal, siendo en apariencia silenciosos para los humanos, pero dentro del umbral auditivo de animales de laboratorio, como las ratas.

Los niveles de sonido se producen especialmente durante las actividades de cuidado del animal, siendo diferentes entre días laborales y fines de semana, y entre el día y la noche.<sup>98, 126</sup> Milligan et al. grabaron el entorno acústico de boxes en las que se alojaba a ratas durante un periodo de 24 h. En una de las instalaciones, hubo un pico en los niveles de sonido entre 90-100 dB en la franja de baja frecuencia durante las horas normales de trabajo. En la franja de alta frecuencia, los niveles también aumentaban durante las horas de trabajo, alcanzando a menudo los 70-85 dB.<sup>126</sup>

Los niveles de exposición al sonido dentro de las cubetas de ratas y en las cubetas adyacentes, mientras los trabajadores llevaban a cabo tareas propias de cuidado (por ejemplo, sacar la cubeta del rack, ponerla en una mesa y volver a colocarla en el rack, poner comida en el comedero), han sido medidos recientemente por Voipio et al. Maniobras rápidas con cubetas que presentaban superficies de acero causaron niveles de exposición acústica que excedían los 90 dB (R) cuando se colocaban las cubetas en los racks y alrededor de 80 dB (R) cuando se retiraba la misma de los racks y se ponía sobre la mesa. Con jaulas de policarbonato, los niveles eran 15 dB (R) más bajos. Llevar a cabo el trabajo con más calma producía niveles de exposición menores en muchos procedimientos (cerca de 10-15 dB (R) de diferencia para cubetas de ambos materiales). Cuando los mismos procedimientos se llevaban a cabo en cubetas adyacentes, la exposición era menor, pero las diferencias eran similares. Al comparar el oído humano con el de las ratas, los niveles de exposición para la sensibilidad auditiva

humana eran cerca de 10-20 dB más elevados que los niveles para ratas.<sup>129</sup>

Se ha discutido la utilidad de usar ruido de enmascaramiento, como la radio, para minimizar los efectos adversos del ruido “nocivo”. Se ha demostrado que el tratamiento musical, llevado a cabo reproduciendo el CD “Adagio” de Herbert Von Karajan, a través de altavoces (a menos de 40 dB) de 9:00 a 14:00 h, durante ocho días, ha reducido la metastaticidad de las células WRC 256 en de ratas macho Sprague-Dawley pertenecientes a dos grupos: sometidas, y no, a estrés auditivo (exponiendo a los animales a la alarma de incendios (100 dB)).<sup>131</sup> Los altavoces de la mayoría de los aparatos de radio domésticos tienen un límite de volumen inferior a 16 kHz y, tal y como demuestran Sales et al., esto no cubriría toda la franja de frecuencia de ruido ambiental a la que está expuesta la mayoría de los animales de laboratorio. El uso de radios en el alojamiento animal podría por lo tanto ser un beneficio para los trabajadores de la instalación, siendo de forma indirecta un beneficio para los animales que estén al cuidado de estos trabajadores,<sup>128</sup> pero es necesario seguir investigando el efecto del ruido de fondo, tal como la radio y diferentes tipos de música, a la hora enmascarar los efectos de ultrasonidos y sonidos a alto volumen.

El sonido puede tomar parte en muchos estudios científicos, no como una variable experimental controlada, sino como una variable del entorno que puede, en algunos casos, confundir los resultados de la investigación con animales,<sup>68</sup> al interferir con el bienestar y estrés de los mismos.

Teniendo en cuenta las diferentes capacidades auditivas de humanos y roedores, y con el objetivo de satisfacer la necesidad de una señal de alarma efectiva en instalaciones para animales de laboratorio que no estresase a los animales cada vez que se probara, se creó una “alarma de incendios silenciosa”. El dispositivo creado producía tonos puros que alternaban entre 430 y 470 Hz, proporcionando un nivel sonoro de 97 dBC a 450 mm - la energía en la señal de alarma estaba por debajo del umbral óptimo de audición para ratones y ratas. Produciendo un ruido “intensamente irritante y perturbador” para los humanos, esta alarma no despertaba ratas y ratones, y en caso de estar despiertos, los roedores no mostraban una respuesta de alarma, movimientos de oreja u otra indicación de perturbación auditiva cuando la “alarma de incendios silenciosa” estaba encendida.<sup>132</sup>

En conclusión, tanto los sonidos para la comunicación como los sonidos del entorno, están presentes en los animalarios, teniendo un variado número de efectos en la fisiología y comportamiento de los mismos, y por consiguiente influyendo sobre el bienestar animal y los

resultados de la investigación. Los sonidos del entorno difieren según las instalaciones y es necesario planear con cuidado antes de construir las, con ayuda de ingenieros acústicos, teniendo en cuenta las diferencias en la percepción sonora entre roedores y humanos,<sup>69</sup> con el objetivo de evitar sonidos ambientales estresantes tanto para el animal como para el personal. Los procedimientos que propicien vocalización tanto audible como ultrasónica deberán llevarse a cabo en un lugar donde estos sonidos no alcancen al resto de los animales (a menos que esto forme parte del experimento).<sup>42</sup> El personal de las instalaciones y los investigadores que trabajen en ella deberán intentar evitar ultrasonidos incontrolados (que podrían interferir con los sonidos para la comunicación entre los animales) y la producción de sonidos audibles. Deberán hacerse mediciones en cada instalación a fin de registrar los ruidos existentes en el entorno y detectar los ultrasonidos.

### **Limpieza y transporte de las cubetas**

Las ratas de laboratorio son alojadas en condiciones estandarizadas y su mantenimiento requiere manipulación humana. Mover a un animal de una cubeta otra mediante manipulación (limpieza de jaulas) o transportar cubetas, con animales dentro, en un laboratorio o entre laboratorios (transporte interno) son procedimientos rutinarios en los animalarios. ¿Pero cómo reaccionan los animales a estos procedimientos? ¿Interfieren con la fisiología y el comportamiento de los animales, afectando a su bienestar causando estrés/angustia, y en caso afirmativo, cuánto tiempo le lleva al animal recuperar su condición fisiológica normal? Esta revisión analiza el impacto de las rutinas en las instalaciones para animales tales como la limpieza de cubetas y el transporte interno de las mismas y sus influencias en la fisiología, comportamiento y bienestar de la rata de laboratorio.

### **Limpieza y transporte de cubetas**

Varios autores han demostrado que la limpieza de cubetas y el transporte interno promueven una respuesta de estrés agudo en los animales de laboratorio. Armario et al. informaron de que la limpieza de las cubetas de machos de rata Sprague-Dawley, alojadas en grupos de tres, elevaba los niveles de corticosterona<sup>133</sup> y prolactina<sup>134</sup> en suero. Estas respuestas de estrés endocrinas fueron medidas 15 min después del momento de estrés agudo (cuando se sangró a las ratas por decapitación) y dependieron de la intensidad del estímulo. Cuando las ratas se sometieron a limpieza de cubetas exclusivamente, los aumentos de corticosterona y prolactina plasmáticos fueron significativos pero inferiores

a cuando las ratas fueron sometidas a limpieza de cubetas seguida de transporte a una nueva habitación. La limpieza de cubetas y el transporte a una habitación ruidosa (alarma de 85 dB) fue más estresante que la limpieza de cubeta y el transporte a una habitación silenciosa.<sup>133, 134</sup> Barrett et al. refirieron una concentración de corticosterona en plasma tres veces mayor en machos de rata Wistar, sangradas después de ser transportadas a un laboratorio que en ratas sangradas en su habitación habitual.<sup>113, 135</sup> Se demostró que mover cubetas de machos de rata Han:Sprague de las estanterías al suelo producía un aumento significativo en los niveles de corticosterona en 5 minutos, alcanzando un máximo a los 15 min y volviendo a niveles iniciales después de 60 min.<sup>136</sup> En este experimento, Gärtner et al. También demostraban que se producía un aumento plasmático significativo de los niveles de prolactina, hormona estimulante del tiroides (HST) y triyodotironina (T3) en los 15 min posteriores al movimiento de las cubetas, y 60 min después, los niveles de estas hormonas permanecían aún elevados.<sup>136</sup> En lo que respecta a los efectos del movimiento de cubetas sobre la RC, Gärtner et al. Informaron de un aumento de 340 a cerca de 450 latidos por minuto (medidos de forma telemétrica en ratas que llevaban un transmisor implantado permanentemente), taquicardia que persistía durante 10-15 min. Otros efectos en la microcirculación, tales como alteraciones del hematocrito, hemoglobina y proteínas del plasma, aumentaron de forma significativa en los 2 min posteriores a mover las cubetas y duraron aproximadamente 10 min.<sup>136</sup> Al mover las cubetas también se encontraron perturbaciones en el metabolismo, que sugerían poder ser consecuencia de alteraciones endocrinas, de la microcirculación y de la activación de sistema simpático-adrenal: la glucosa plasmática aumentó significativamente 3-8 min después de mover las cubetas; el lactato y piruvato en plasma aumentaron 2-3 veces por encima de los niveles de control 1-3 minutos después de mover las cubetas. Estos efectos en el metabolismo solo duraron 10 minutos.<sup>136</sup>

También se ha asociado la activación del sistema nervioso simpático con los procedimientos rutinarios tales como la limpieza de cubetas. Boer et al. informaron de aumentos significativos en la adrenalina y noradrenalina plasmáticas inmediatamente después de retirar suavemente a machos de rata Wistar cateterizados (alojados de forma individual) de sus cubetas y colocándolos en una nueva (idéntica a la anterior pero sin cama, comida ni agua) durante un periodo de 15 min antes de volver a colocarlas de nuevo en su cubeta original.<sup>137</sup> Se detectó también un incremento significativo en las concentraciones de corticosterona y glucosa en plasma 15 min después de introducir a las ratas en la nueva cubeta, volviendo a niveles

iniciales en  $t=45$  min. Se asumió que el aumento en los niveles de catecolaminas, corticosterona y glucosa que se encontraron en ratas que habían sido manipuladas y colocadas en cubetas nuevas era el resultado de la actividad psicológica en respuesta a los cambios en el entorno (por ejemplo miedo o estímulo emocional), en lugar de ser el resultado de la actividad física o de cambios periféricos fisiológicos inducidos por esta alteración del entorno.<sup>137</sup>

A pesar de utilizar anestésicos que ya no son recomendables,<sup>138</sup> Tabata et al. encontraron un aumento significativo en los niveles de glucosa plasmática en ratones tras la manipulación y transporte de la cubeta a una sala adyacente, con la normalización de los niveles de glucosa aproximadamente una hora más tarde. Cuando se llevó a cabo el mismo procedimiento con ratas F344 y Sprague-Dawley (machos y hembras), parecía haber un efecto muy pequeño o no observable en los niveles de glucosa en sangre.<sup>139</sup> Los autores defienden que las ratas podrían acostumbrarse con más facilidad que los ratones al procedimiento de manipulación empleado, lo que podría haber reducido la liberación de glucosa al torrente sanguíneo como respuesta fisiológica al estrés.<sup>135, 139</sup>

También se han analizado las respuestas de comportamiento de ratas de laboratorio a la limpieza de cubetas. Se ha demostrado que el comportamiento de machos de rata Sprague-Dawley en sus cubetas varía según el momento del día y el régimen de limpieza. Las ratas muestran mayor actividad en los días de limpieza, incrementando comportamientos como moverse, acicalarse, cavar, trepar y permanecer sentadas menos tiempo.<sup>140</sup> Saibaba et al. interpretaron este aumento de actividad tras el cambio de cubeta como un signo de perturbación o una respuesta a la novedad, ya que el entorno olfativo, y posiblemente táctil y visual, estarían alterados en la cubeta limpia y podrían estimular comportamientos exploratorios. También se ha referido que los animales tendían a estar más activos por la mañana que por la tarde, lo que podría estar relacionado con la llegada del personal y el comienzo de la jornada laboral, con un aumento general del nivel de ruido.<sup>140</sup>

Más recientemente, utilizando la radioteleetría, se han estudiado las respuestas fisiológicas a la limpieza de cubetas: se han hallado aumentos en la RC y la presión sanguínea tanto en machos como en hembras de rata en respuesta a múltiples procedimientos de manipulación.<sup>141-146</sup> Por ejemplo, al estudiar los efectos de la limpieza rutinaria de las cubetas sobre los parámetros cardiovasculares y de comportamiento, Duke et al. observaron un repentino aumento de la presión arterial sistólica y diastólica, la presión arterial media (PAM), RC, y comportamiento en la jaula (movimiento, actividad y acicalado) en machos

adultos de rata Sprague-Dawley cuando se les colocaba en cubetas limpias. Los aumentos de RC y PAM en respuesta al cambio de cubeta tenían una duración aproximada de 45-60 min. Las ratas que presenciaron este procedimiento no mostraron cambios significativos en la RC o PAM. Los animales manipulados también se mostraron alterados, dando muestras de actividad, movimiento y acicalado durante al menos 45 min, mientras que los animales que fueron testigos dieron muchas menos muestras de actividad, y la mayoría volvieron a dormirse unos 15-30 min después del cambio de jaula. La adición de una pequeña cantidad de lecho sucio, procedente de la cubeta anterior, no modificó el aumento de RC, PAM o comportamiento, lo que indica que las referencias olfativas familiares no contrarrestaron la novedad de la jaula nueva.<sup>141</sup> Sin embargo, en ratones macho originó una gran diferencia en el número de encuentros agresivos dependiendo de la transferencia, o no, de lecho sucio desde la cubeta anterior a la nueva.<sup>147</sup> Las ratas que no habían sido cambiadas de cubetas en un periodo de dos semanas presentaban un aumento más prematuro y rápido de RC y PAM en respuesta al cambio de cubeta, presentando una respuesta cardiovascular más prolongada en comparación con la respuesta de ratas cuya cubeta había sido cambiada cada semana.<sup>141</sup> El acicalado era menor en los últimos 15 min del periodo de observación en los animales cuya cubeta se había cambiado semanalmente en comparación con aquellos cuya jaula no se había cambiado en dos semanas. Al repetir estos experimentos durante cuatro semanas consecutivas, los investigadores hallaron que las respuestas cardiovasculares y de comportamiento al cuarto cambio no eran diferentes de aquellas observadas la primera semana, indicando que los animales no se acostumbraban al procedimiento.<sup>141</sup>

Al medir la respuesta cardiovascular de machos adultos de rata Sprague-Dawley a varios procedimientos comunes (cambio de jaula, inmovilización e inyección subcutánea, inmovilización e inyección en vena en la cola, exposición a olor de orina y heces de ratas estresadas, exposición al olor de sangre seca de rata) mediante radioteleetría, Sharp et al.<sup>145</sup> hallaron también, aumentos significativos en la RC de ratas alojadas individualmente, con un compañero de cubeta o con tres, pero la RC de las ratas que estaban en cubetas de cuatro en cuatro disminuía más rápidamente, alcanzando niveles basales en 30 min. En respuesta al cambio de cubeta rutinario, las ratas alojadas de forma individual o con un compañero de cubeta mostraron aumentos significativos en la RC que se observaron durante 90-120 min después del traslado a la nueva cubeta. Los cambios en PAM después de limpiar las cubetas mostraban los mismos patrones que la RC, excepto en el caso de las ratas alojadas de cuatro en cuatro, donde la PAM descendía

de forma significativa por debajo de los niveles basales en los 90-180 min después del cambio de cubeta.<sup>145</sup> Se sugirió, que el descenso en RC y PAM por debajo de los niveles basales en las ratas alojadas de cuatro en cuatro, después del cambio rutinario de cubeta, se debía a la exposición al olor amoniacal de los materiales sucios que se habían acumulado en la cubeta después de los cuatro días, en los que no se había cambiado la cubeta por última vez. La manipulación de ratas también afectó a su comportamiento, aumentando los comportamientos activos tales como movimiento y acicalado, siendo estos aumentos más propios de ratas alojadas de forma individual que de las alojadas en grupo.<sup>145</sup> Al hacer las pruebas en hembras adultas de rata Sprague-Dawley, los mismos autores hallaron también aumentos significativos de RC tras el cambio rutinario de cubeta que duraban 30-90 min antes de volver a niveles basales, lo que sugería que las ratas estaban estresadas.<sup>143</sup> En este estudio, también se demostró que transportar a las ratas a otro laboratorio para inyección subcutánea también aumentaba la RC significativamente (de forma equivalente en todas las condiciones de alojamiento). Los comportamientos activos de las hembras de rata en la cubeta de origen se incrementaron durante al menos 30 min después del procedimiento.<sup>143</sup> Estar alojadas en grupo normalmente reducía la respuesta de estrés.<sup>143, 145</sup> Las respuestas fisiológicas observadas fueron similares durante el cambio de cubeta o el cambio de cubeta simulado (donde se devolvía a las ratas a la cubeta de origen), sugiriendo que las respuestas proceden de la manipulación física en lugar de a los aspectos poco familiares de las cubetas nuevas.<sup>143</sup> Sharp et al. no registraron diferencias dignas de mención en las respuestas cardiovasculares (RC y PAM) y de comportamiento producidas por el cambio de cubeta o por presenciar el cambio de estas, entre hembras en diferentes fases del ciclo estral (proestro – estro y metaestro – diestro), pero los autores notaron que las hembras mostraban más respuestas cardiovasculares (relacionadas con el estrés) y de aumento de actividad que los machos en el estudio anterior, lo que sugiere una influencia del estado hormonal de las gónadas.<sup>146</sup> Las hembras que presenciaron el cambio de cubeta también mostraron una respuesta cardiovascular mayor que los machos, y las hembras mostraron aumentos dignos de mención en la respuesta a entrar en la habitación, mientras que los machos no. En lo que respecta al comportamiento en la cubeta de origen, los machos mostraron el doble de comportamientos de sueño y diferencias mucho más grandes entre grupos manipulados y testigos que las hembras, y no se advirtió efecto evidente alguno, de las fases del ciclo estral en hembras.<sup>146</sup>

En otro estudio de Sharp y colaboradores, se informó que presenciar procedimientos rutinarios tales

como el cambio de cubeta, no induce respuestas significativas relacionadas con el estrés tales como las observadas en los animales sometidos a la limpieza de cubeta. Solamente los machos de rata Sprague-Dawley alojados de forma individual, o con un único compañero de cubeta, presentaban pequeños aumentos en la RC, PAM y comportamientos en la cubeta de origen al presenciar el cambio de la misma.<sup>142</sup> Por el contrario, las hembras de rata Sprague-Dawley que presenciaban cambios de cubeta mostraron respuestas mayores, pero los aumentos en RC y comportamientos activos en la cubeta de origen también fueron más reducidos en hembras alojadas en grupos en comparación con hembras alojadas individualmente, lo que sugiere que el alojamiento grupal reduce el estrés o el potencial de estrés.<sup>144</sup>

En 2006, un estudio entre laboratorios llevado a cabo por Burn et al. demostró de que la frecuencia en la limpieza de las cubetas no tenía un impacto claro sobre el bienestar de las ratas. Se mantuvo a machos de ratas Sprague-Dawley y Wistar, alojados en grupos de cuatro, en cuatro animalarios distintos, y sus cubetas se limpiaron dos veces por semana, semanalmente o cada dos semanas. Las cubetas contenían lechos de virutas de álamo o de papel absorbente. Entre otros parámetros, se monitorizaron las agresiones, heridas y estado general de salud, aumento de peso, facilidad de manipulación y concentración de amoníaco en la cubeta. La limpieza frecuente reducía las concentraciones de amoníaco y la facilidad de manipulado, y las pequeñas escaramuzas no agresivas eran más frecuentes en ratas cuyas cubetas se limpiaban una vez por semana. Sin embargo, no se asoció ningún daño o perjuicio claros sobre el bienestar, con ninguna de las frecuencias de limpieza en estos grupos de ratas macho, ya que no se encontraron diferencias en ritmos de crecimiento o estado de salud general, al comparar animales en cubetas limpiadas con frecuencia de aquellos en cubetas limpiadas con menos frecuencia.<sup>148</sup> De acuerdo con estudios mencionados anteriormente (por ejemplo los de Duke et al.<sup>141</sup> y Sharp et al.<sup>145</sup>), al observar el comportamiento de machos de Sprague-Dawley y Wistar inmediatamente después de la limpieza de las cubetas, Burn et al. hallaron un aumento en la actividad general de las ratas, incluyendo caminar, manipular los lechos y alimentarse, que estuvieron por encima de los niveles basales durante los 30 min del periodo de observación; periodo durante el cual el número de ratas descansando no volvió a los niveles anteriores a la limpieza de la cubeta. Se notó un aumento relevante en las pequeñas escaramuzas no agresivas por encima de los niveles anteriores a la limpieza, pero este efecto fue transitorio y después de 15 min retornó a los niveles anteriores a la limpieza. Puesto que la frecuencia en la limpieza no afectó a la cantidad de escaramuzas

posteriores a la limpieza, Burn et al. sugirieron que el aumento no se debe a ningún cambio relativo en el entorno olfativo, ni está influenciado por lo acostumbradas que estén las ratas a la perturbación. En este estudio, se observó que las ratas se movían con más frecuencia hacia áreas resguardadas después de la limpieza, lo que podría indicar que estaban intentando evitar la luz, mientras que las ratas no molestadas (el día anterior a la limpieza) permanecían en el lugar de descanso en el que habían estado durante el periodo de oscuridad, o posible explicación estaría relacionada con un comportamiento exploratorio motivado por el entorno de la nueva cubeta. No se encontraron signos de comportamiento que sugiriesen que el aumento de la actividad después de la limpieza fuese una respuesta de estrés agudo que se correspondiera con un efecto negativo de la limpieza de cubetas sobre el bienestar de la rata.<sup>149</sup> Se apreció cromodaciorrea (una secreción rojo oscuro relacionada con el estrés, que segrega la glándula de Harder cercana al globo ocular) alrededor del hocico de las ratas tras el periodo de observación del comportamiento (por ejemplo en los 35-45 min posteriores a la limpieza de la cubeta) y se demostró que era mayor en el día previo a la limpieza, lo que sugería que tener lechos sucios era más estresante, que el procedimiento de limpieza por sí mismo, puesto que sólo se midió tras el periodo de observación, esta secreción podría haber sido limpiado por las ratas antes de su anotación (se ha demostrado que la cromodaciorrea se presenta entre 16 y 30 min después de la inducción del estrés agudo, mediante la inmovilización de los miembros).<sup>149, 150</sup>

## Efectos del transporte interno

Como se ha mencionado anteriormente, el transporte interno de las ratas induce respuestas fisiológicas diversas (endocrina, cardiovascular y metabólica), tales como aumentos de la corticosterona, prolactina, TSH y T3<sup>113, 133, 134, 136</sup>; aumento de la RC; aumento en la hemoglobina y las proteínas plasmáticas; e incremento en la concentración plasmática de glucosa.<sup>136</sup> En la literatura se pueden encontrar otros cambios fisiológicos o del comportamiento derivados del transporte interno de las ratas de laboratorio, mostrando una respuesta de estrés agudo a los procedimientos de transporte, o a presenciarlo simplemente. Por ejemplo, se ha mostrado que el comportamiento de ratas Wistar Cpb:WU no transportadas se ha visto alterado en presencia de ratas que habían sido transportadas en sus cubetas con un carrito empujado por la sala durante 2-3 minutos.<sup>151</sup> Se utilizó una caja abierta con dos pequeños campos adyacentes y cada animal (uno transportado y otro no) se situaba en uno de ellos y se evaluaban sus comportamientos: las hembras de rata



transportadas olisqueaban y se movían mucho menos y se acicalaban más (sugiriendo la inducción estrés por el transporte), mientras que las ratas no transportadas olisqueaban mucho más y tendían a orinar con más frecuencia. Ya que no había contacto físico entre las ratas transportadas y las no transportadas, Laa et al.<sup>151</sup> sugirieron que la comunicación podría haberse producido mediante sonidos u olores por parte de las ratas transportadas, afectando al comportamiento de las no transportadas.

Más recientemente, Dallmann et al.<sup>152</sup> han demostrado que mover la cubeta de machos de rata F344/Hw alojados en grupo dentro de la habitación, o transportar los animales, dentro de su cubeta, entre salas de alojamiento y de experimentación (a través de un pasillo ruidoso con sonido de fondo constante causado por los sistemas de ventilación y salas de alojamiento de cerdos en el otro extremo) resultaba en un aumento significativo de la TC ( $T_c$ ). Al mover la cubeta dentro de la sala, la hipertermia inducida por estrés (HIS) se correspondía con un aumento en la  $T_c$  de las ratas de más de 0,5 °C durante los 120 min posteriores. El transporte entre salas demostró aumentar la  $T_c$  de las ratas durante al menos 60 min. El hecho de que la HIS durase 120 min al transportar la cubeta desde la estantería hasta la mesa dentro de la misma sala, hizo que Dallmann et al. sugiriesen que, antes de empezar un procedimiento experimental, se lleve a cabo un proceso de adaptación de hasta 120 min, o incluso más largo.<sup>152</sup>

### **Limpieza de las cubetas y contacto con olores**

Los olores a que se exponen los animales de laboratorio durante la limpieza de las cubetas podrían representar un elemento estresante y tener un impacto sobre el bienestar del animal. El personal que lleva a cabo las rutinas de los cambios de cubeta y limpieza, puede ser una fuente de olores, tanto personales como procedentes de otras cubetas o boxes. Las ratas pueden sentir miedo de los humanos que transporten olores de mascotas<sup>69</sup> o de otros animales en otras salas de la instalación vía fómites (ropa, manos), lo que es una razón importante por la que todo el personal, que trabaja en la instalación, debería lavarse las manos y cambiarse las batas de laboratorio al cambiar de sala,<sup>42</sup> evitando el transporte de olores (inter e intra específicos) y también evitando el contacto de sus ropas utilizadas fuera de las instalaciones con los animales de laboratorio. Presentar olores de depredadores (por ejemplo olor de la piel o el pelo de un gato) a las ratas de laboratorio puede motivar comportamientos defensivos, miedo y ansiedad (revisado por Blanchard et al.<sup>153</sup>). Los olores humanos naturales o los olores de perfume y desodorante asociados a los humanos

también pueden ser estresantes para las ratas de laboratorio. Por ejemplo, los aromas (compuestos químicos volátiles), que a menudo están presentes en los productos de perfumería, pueden influenciar actividad HPA y respuestas inmunológicas<sup>154</sup> o tener efectos ansiolíticos para las ratas.<sup>155</sup> Aunque el efecto de los olores humanos (naturales o artificiales) en las ratas necesita seguir investigándose, los humanos deberían evitar introducir olores de depredadores, perfumes y desodorantes en las instalaciones para animales en las que estén en contacto con animales de laboratorio, durante procedimientos rutinarios de cría (tales como limpieza de cubetas) o procedimientos científicos.

### **Limpieza y ventilación de las jaulas**

Otro aspecto que afecta a la limpieza de las cubetas y al bienestar animal es la ventilación. El movimiento del aire en la cubeta está relacionado con otros importantes factores ambientales como la temperatura (afectando a la capacidad termorreguladora de los animales) y humedad relativa. El nivel de ventilación y renovación del aire en la cubeta afecta la calidad micro ambiental del aire en términos de concentración de microorganismos, partículas de polvo y gases nocivos (tales como amoníaco y dióxido de carbono).<sup>10</sup> Para establecer la frecuencia de la limpieza de las cubetas en los animalarios, deben considerarse todos estos factores, debido a sus efectos en los animales. Por ejemplo, se demostró que el predominio de la neumonía aumentaba con los niveles de amoníaco dentro de la jaula (de 25 a 250 ppm) y los cambios patológicos se hallaron en el tracto respiratorio de las ratas expuestas a lechos sucios con niveles de  $NH_3$  de 100-200 ppm, lo que puede darse en cubetas (sin filtro en las tapas) que no se han limpiado en una semana.<sup>156, 157</sup> Las concentraciones más altas de amoníaco tienen lugar en condiciones de humedad elevada<sup>157</sup> y el tipo de material para los lechos también influye.<sup>158</sup> Los niveles de amoníaco y dióxido de carbono en cubetas ventiladas individualmente (CVI) fueron estudiados por Silverman et al. durante un periodo de siete días sin limpiar las cubetas. En este estudio, los niveles de amoníaco alcanzaron valores de 500 ppm después de tres días, y los niveles de dióxido de carbono en el interior de las cubetas, aumentaron con rapidez hasta alcanzar valores de 10.000 ppm.<sup>158</sup> En otro estudio que analizaba diferentes índices de ventilación y frecuencias de cambio de cubetas y su impacto en ratones C57BL/6J alojados en cubetas ventiladas, Reeb-Whitaker et al.<sup>159</sup> concluyeron que cambios de cubeta cada 14 días e índices de ventilación de 60 renovaciones de aire /hora (a los que los niveles de amoníaco fueron de alrededor de 50 ppm en ratones alojados de tres en tres) proporcionan condiciones óptimas

para la salud animal y la reproducción y no tenían efectos adversos para la salud. Se necesita realizar más estudios para contar con más información sobre las consecuencias para el bienestar de las concentraciones elevadas de amoníaco, y no se cuenta con pautas sobre las concentraciones máximas de amoníaco a las que puede exponerse a los roedores. Basándose en las pautas para la exposición en humanos y en literatura veterinaria, Silverman et al. sugirieron que una concentración de 50 ppm dentro de la cubeta debería conducir a la limpieza de los ratones alojados en CVI o cubetas desechables.<sup>158</sup> Los diferentes sistemas de CVI también pueden proporcionar diferentes micro ambientes dentro de la jaula, y debe estudiarse cada caso.

Como ya se ha mencionado, es necesaria la renovación constante del aire, y es esencial el cambio adecuado de aire en el entorno cerrado de las ratas para controlar la temperatura micro ambiental, la humedad y la calidad del aire.<sup>10</sup> Los animalarios, normalmente, cuentan con 15-20 renovaciones/h. en las salas, tal y como indica el Apéndice A del Convenio Europeo ETS 123.2 Los sistemas CVI mejoran la ventilación dentro de las cubetas para alcanzar mayores renovaciones de aire por hora, permitiendo reducir la frecuencia del cambio de cubeta, pero estos sistemas constituyen una fuente, relativamente innovadora, de potencial incomodidad. Para los humanos, la velocidad del aire que exceda 0,2 m/s se considera corriente, y esto también se acepta generalmente como un límite máximo para los roedores.<sup>160</sup> Un índice de ventilación mayor dentro de la cubeta podría inducir estrés crónico y pérdida de calor debido a las corrientes. Se ha demostrado, con test de preferencia, que las ratas escogen cubetas con menos de 80 renovaciones de aire /h, donde la entrada de aire se hace por la parte superior y se proporcionaba material para lechos. Por lo tanto, es importante tener en cuenta la localización de la entrada de aire en la cubeta (por la pared o por el techo), el número de renovaciones de aire/h. y la presencia de material para nidos, a la hora de considerar el impacto del alojamiento en CVI sobre el bienestar de los ratones.<sup>162</sup>

En conclusión, se demostró que efectivamente, los procedimientos habituales de cría y mantenimiento, inducen respuestas relacionadas con el estrés en los roedores de laboratorio. Como se mencionó anteriormente, la limpieza de las cubetas y el transporte interno, tienen un impacto considerable en las respuestas fisiológicas y en el comportamiento de las ratas, propias de una respuesta de estrés agudo, pero aún no se ha probado que produzcan un impacto claro sobre el bienestar de las mismas. Los investigadores deberían ser cuidadosos, cuando estén planificando un estudio, al establecer horarios para la

limpieza de las cubetas. Unos sistemas de ventilación adecuados deberían proporcionar un buen control de la ventilación en los animalarios, y por lo tanto a nivel de cada cubeta. Para establecer la frecuencia en la limpieza, el personal de las instalaciones deberían tener la posibilidad de medir el micro ambiente dentro de la cubeta (por ejemplo la humedad, temperatura, niveles de gases nocivos) y estos datos deberían estar también a disposición de los investigadores. Debería tenerse cuidado al clasificar los cuidados como no estresantes, simplemente porque sean rutinarios. Estos procedimientos comunes pueden influir sobre los datos experimentales si no se toman en cuenta y no se controlan. Por ejemplo, a la hora de medir las respuestas endocrinas periféricas a los agentes estresantes, los investigadores deberían tomar rápidamente muestras de sangre (por ejemplo, en los 100 s posteriores a tocar la cubeta del animal por primera vez) para evitar la influencia de la respuesta de estrés a la manipulación de la cubeta/animal con los resultados experimentales<sup>136</sup>; en estudios que requieren la determinación de parámetros cardiovasculares basales, Sharp et al. recomendaron que no se obtuvieran datos durante al menos las 2 horas posteriores a los procedimientos comunes para el mantenimiento/cría. Mediante el uso de radiotelemetría en ratones, Meijer demostró que las respuestas de FC y TC se equiparaban a las respuestas de corticosterona frente a a varios procedimientos rutinarios (por ejemplo diferentes métodos de inmovilización, inyecciones por diferentes vías, limpieza de cubetas). Teniendo en cuenta las respuestas de estrés agudo de los animales de laboratorio a los procedimientos rutinarios, Meijer<sup>163</sup> estableció que los valores basales de FC, TC o corticosterona no deberían evaluarse directamente después de que los animales hubieran sido sometidos a estos procedimientos: se recomendaba un periodo de recuperación de al menos una o dos horas para mejorar los procedimientos experimentales y obtener datos fiables para las medidas basales.

Otros agentes estresantes durante la limpieza de cubetas puede ser el contacto con humanos y los olores que transportan. Al manipular a los animales para limpiar las cubetas, el personal debería evitar usar ropas que hayan estado en contacto con depredadores naturales de las ratas, el uso de desodorantes y perfumes, y utilizar la protección apropiada para evitar la propagación del olor.

## Conclusión

La interacción humana y los factores físicos del entorno son parte de los estímulos que se presentan a diario a los animales de laboratorio, influenciando su comportamiento y fisiología y contribuyendo a su bienestar.

Algunas condiciones ambientales pueden inducir respuestas de estrés y, cuando el animal no es capaz de mantener su homeostasis en presencia de ese agente estresante en particular, su bienestar se ve amenazado y el animal podría sufrir angustia. Factores ambientales tales como la estructura, tamaño y elementos de la cubeta, niveles de NH<sub>3</sub> y CO<sub>2</sub>, luz (intensidad, longitud de onda, fotoperiodo y frecuencia de parpadeo), sonidos, aire/ventilación, temperatura, humedad relativa, olores, presencia/ausencia de patógenos y presencia/interacción humanas son tan importantes como la presencia o ausencia de miembros de la misma especie, su sexo, y la capacidad de predecir y controlar el entorno en lo que a implicaciones para el bienestar del animal se refiere.

Las ratas prefieren intensidades de luz bajas, y un fotoperiodo bien controlado contribuirá, sin duda, a un ritmo circadiano estable. La posición de la cubeta en un rack o sala en relación con la fuente de luz, o la presencia de objetos que permitan esconderse al animal son factores determinantes para la cantidad de luz a la que el animal está expuesto.

La sensibilidad auditiva de los roedores es diferente de la de los humanos, y debería prestarse especial atención a la producción de sonidos y ultrasonidos en las instalaciones. Los ultrasonidos son más difíciles de controlar porque son audibles para las ratas pero no para los humanos. No está completamente claro si un ruido de fondo tal como una radio contribuye al bienestar del animal de laboratorio, pero tampoco se demostró que los molestará y podría ser un “enriquecimiento” para el personal que se encarga de su cuidado y por consiguiente beneficiará a los animales. Si se considera la posibilidad de usar una radio en habitaciones para ratas, deberá tenerse cuidado de mantener el volumen bajo.

Los procedimientos rutinarios en los animalarios incluyen trasladar a los animales de una cubeta sucia a una limpia (limpieza de cubetas), y transportar cubetas, con animales en su interior, en una misma sala o de una sala a otra (transporte interno). A pesar de ser normalmente procedimientos simples y relativamente rápidos, varios autores han señalado que inducen respuestas de estrés agudo en los animales de laboratorio. El comportamiento y fisiología de las ratas de laboratorio pueden verse alterados como resultado de estos procedimientos durante periodos de una o dos horas. Aunque no está claro si la limpieza de jaulas y el transporte interno afectan al bienestar animal, estos procedimientos han demostrado alterar los parámetros fisiológicos y de comportamiento, temporalmente. Analizando la literatura, es obvio que los procedimientos “simples” de rutina no pueden considerarse como no estresantes para los animales, aunque se adopten las mejores

prácticas y las condiciones de alojamiento sean las más adecuadas para la especie animal. Limpiar las cubetas o simplemente moverlas de una sala a otra interfiere con el comportamiento del animal y su fisiología, y podría interferir con los resultados experimentales si no se controla.

Considerando la amplia lista de efectos fisiológicos y de comportamiento que desencadenan la luz, el entorno auditivo y las técnicas de manejo/cría, reflejados en la literatura y analizados aquí, es obvio que estos, son factores ambientales muy importantes que deben ser controlados en el animalario para evitar causar molestias a los animales de laboratorio que puedan llevar a un pobre bienestar animal y en consecuencia a pobres resultados experimentales. Las rutinas de trabajo en los animalarios, como la limpieza de cubetas y prácticas simples, como el transporte de cubetas a las salas de experimentos, deberían también establecerse con claridad y tomarse en cuenta a la hora de planificar experimentos con animales, aunque aún se necesita más investigación para comprender totalmente su impacto sobre los animales de laboratorio.

## REFERENCIAS

- 1 Russell WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*. London: Methuen, 1959
- 2 Council of Europe Convention ETS 123. *European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes*. 1986
- 3 Baumans V. Science-based assessment of animal welfare: laboratory animals. *Rev Sci Tech* 2005;24:503–13
- 4 Koolhaas JM, Baumans V, Blom HJM, von Holst D, Timmermans PJA, Wiepkema PR. Behaviour, stress and well-being. In: Van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC, eds. *Principles of Laboratory Animal Science: A Contribution to the Humane Use and Care of Animals and to the Quality of Experimental Results*. 2nd edn. Amsterdam: Elsevier Science BV, 2001: 77–102
- 5 European Union. Directive 86/609/EEC: Directive on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. 1986
- 6 Morton DB, Hau J. Welfare assessment and humane endpoints. In: Hau J, Van Hoosier GL Jr, eds. *Handbook of Laboratory Animal Science: Essential Principles and Practices*. Boca Raton: CRC Press LLC, 2003:457–86
- 7 Van der Harst J. *Tools to Measure and Improve Welfare of Laboratory Rats: Reward-related Behaviour and Environmental Enrichment* (PhD thesis). Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, 2003
- 8 Wiepkema PR, Koolhaas JM. Stress and animal welfare. *Anim Welf* 1993;2:195–218
- 9 Brambell Committee. *Report of the Technical Committee to enquire into the welfare of animals kept under intensive livestock husbandry systems*. London: Her Majesty's Stationary Office, 1965: Report No: Command paper 2836

- 10 Clough G. Environmental effects on animals used in biomedical research. *Biol Rev* 1982;57:487–523
- 11 Koolhaas JM. The laboratory rat. In: Poole T, ed. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals: Terrestrial Vertebrates*. 7th edn. Oxford: Blackwell Science, 1999:313–30
- 12 Moberg GP. Biological response to stress: implications for animal welfare. In: Moberg GP, Mench JA, eds. *The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare*. Wallingford, UK: CABI Publishing, 2000:1–21
- 13 Beynen AC, Gartner K, Van Zutphen LFM. Standardization of animal experimentation. In: Van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC, eds. *Principles of Laboratory Animal Science: A Contribution to the Humane Use and Care of Animals and to the Quality of Experimental Results*. 2nd edn. Amsterdam: Elsevier, 2001:103–10
- 14 Hurst JL. Introduction to rodents. In: Poole T, ed. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals: Terrestrial Vertebrates*. 7th edn. Oxford: Blackwell Science, 1999:262–73
- 15 Renner MJ, Rosenzweig MR. Social interactions among rats housed in grouped and enriched conditions. *Dev Psychobiol* 1986;19:303–13
- 16 Devenport L, Dallas S, Carpenter C, Renner MJ. The relationship between adrenal steroids and enrichment-induced brain growth. *Behav Neural Biol* 1992;58:45–50
- 17 Blom HJ, Van Tintelen G, Van Vorstenbosch CJ, Baumans V, Beynen AC. Preferences of mice and rats for types of bedding material. *Lab Anim* 1996;30:234–44
- 18 Vesell ES. Induction of drug-metabolizing enzymes in liver microsomes of mice and rats by softwood bedding. *Science* 1967;157:1057–8
- 19 Li Z, Okano S, Yoshinari K, et al. Soft-hydrothermal processing of red cedar bedding reduces its induction of cytochrome P450 in mouse liver. *Lab Anim* 2009;43:205–11
- 20 Jacobs GH, Fenwick JA, Williams GA. Cone-based vision of rats for ultraviolet and visible lights. *J Exp Biol* 2001;204:2439–46
- 21 Jacobs GH, Neitz J, Deegan JF. Retinal receptors in rodents maximally sensitive to ultraviolet light. *Nature* 1991;353:655–6
- 22 Perez J, Perentes E. Light-induced retinopathy in the albino rat in long-term studies. An immunohistochemical and quantitative approach. *Exp Toxicol Pathol* 1994;46:229–35
- 23 Semple-Rowland SL, Dawson WW. Retinal cyclic light damage threshold for albino rats. *Lab Anim Sci* 1987;37:289–98
- 24 Rao GN. Light intensity-associated eye lesions of Fischer 344 rats in long-term studies. *Toxicol Pathol* 1991;19:148–55
- 25 Penn JS, Baker BN, Howard AG, Williams TP. Retinal light-damage in albino rats: lysosomal enzymes, rhodopsin, and age. *Exp Eye Res* 1985;41:275–84
- 26 Organisciak DT, Darrow RM, Barsalou L, et al. Light history and age-related changes in retinal light damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:1107–16
- 27 Blom HJM, Van Tintelen G, Baumans V, Van den Broek J, Beynen AC. Development and application of a preference test system to evaluate housing conditions for laboratory rats. *Appl Anim Behav Sci* 1995;43:279–90
- 28 Schlingmann F, De Rijk H, Pereboom W, Remie R. Avoidance as a behavioural parameter in the determination of distress amongst albino and pigmented rats at various light intensities. *Anim Technol* 1993;44:87–96
- 29 Schlingmann F, De Rijk H, Pereboom W, Remie R. Light intensity in animal rooms and cages in relation to the care and management of albino rats. *Anim Technol* 1993;44:97–107
- 30 Penn JS, Naash MI, Anderson RE. Effect of light history on retinal antioxidants and light damage susceptibility in the rat. *Exp Eye Res* 1987;44:779–88
- 31 Penn JS, Anderson RE. Effect of light history on rod outer-segment membrane composition in the rat. *Exp Eye Res* 1987;44:767–78
- 32 Schremser JL, Williams TP. Rod outer segment (ROS) renewal as a mechanism for adaptation to a new intensity environment. I. Rhodopsin levels and ROS length. *Exp Eye Res* 1995;61:17–23
- 33 Organisciak DT, Darrow RM, Barsalou L, Kutty RK, Wiggert B. Susceptibility to retinal light damage in transgenic rats with rhodopsin mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:486–92
- 34 Case CP, Plummer CJ. Changing the light intensity of the visual environment results in large differences in numbers of synapses and in photoreceptor size in the retina of the young adult rat. *Neuroscience* 1993;55:653–66
- 35 Organisciak DT, Darrow RM, Barsalou L, Kutty RK, Wiggert B. Circadian-dependent retinal light damage in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:3694–701
- 36 Williams DI. Maze exploration in the rat under different levels of illumination. *Anim Behav* 1971;19:365–7
- 37 Vanderschuren LJ, Niesink RJ, Spruijt BM, Van Ree JM. Influence of environmental factors on social play behavior of juvenile rats. *Physiol Behav* 1995;58:119–23
- 38 Hole G. Proximity measures of social play in the laboratory rat. *Dev Psychobiol* 1991;24:117–33
- 39 Clough G. The animal house: design, equipment and environmental control. In: Poole T, ed. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals: Terrestrial Vertebrates*. 7th edn. Oxford: Blackwell Science, 1999:120–4
- 40 McCormack CE, Sontag CR. Entrainment by red light of running activity and ovulation rhythms of rats. *Am J Physiol* 1980;239:R450–3
- 41 Spalding JF, Holland LM, Tietjen GL. Influence of the visible color spectrum on activity in mice. II. Influence of sex, color, and age on activity. *Lab Anim Care* 1969;19:209–13
- 42 Wersinger SR, Martin LB. Optimization of laboratory conditions for the study of social behavior. *ILAR J* 2008;50:64–80
- 43 Ikeda M, Sagara M, Inoue S. Continuous exposure to dim illumination uncouples temporal patterns of sleep, body temperature, locomotion and drinking behavior in the rat. *Neurosci Lett* 2000;279:185–9
- 44 Inouye ST, Kawamura H. Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic 'island' containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:5962–6
- 45 Mitchell JA, Yochim JM. Influence of environmental lighting on duration of pregnancy in the rat. *Endocrinology* 1970;87:472–80
- 46 Beys E, Hodge T, Nohynek GJ. Ovarian changes in Sprague-Dawley rats produced by nocturnal exposure to low intensity light. *Lab Anim* 1995;29:335–8
- 47 Depre's-Brummer P, Levi F, Metzger G, Touitou Y. Light-induced suppression of the rat circadian system. *Am J Physiol* 1995;268:R1111–16
- 48 Albers HE, Gerall AA, Axelson JF. Circadian rhythm dissociation in the rat: effects of long-term constant illumination. *Neurosci Lett* 1981;25:89–94
- 49 Briaud SA, Zhang BL, Sannajust F. Continuous light exposure and sympathectomy suppress circadian rhythm of blood pressure in

- rats. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2004;9:97–105
- 50 Scheer FA, Pirovano C, Van Someren EJ, Buijs RM. Environmental light and suprachiasmatic nucleus interact in the regulation of body temperature. *Neuroscience* 2005;132:465–77
- 51 Welberg L, Thiruvikraman KV, Plotsky PM. Combined pre- and postnatal environmental enrichment programs the HPA axis differentially in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology* 2006;31:553–64
- 52 Morimoto Y, Oishi T, Arisue K, Ogawa Z, Tanaka F. Circadian rhythm of plasma corticosteroid in adult female rats: chronological shifts in abnormal lighting regimens and connection with oestrous cycle. *Acta Endocrinol (Copenhagen)* 1975;80:527–41
- 53 Eastman C, Rechtschaffen A. Circadian temperature and wake rhythms of rats exposed to prolonged continuous illumination. *Physiol Behav* 1983;31:417–27
- 54 Honma S, Kanematsu N, Katsuno Y, Honma K. Persistence of circadian oscillation while locomotor activity and plasma melatonin levels became aperiodic under prolonged continuous light in the rat. *Neurosci Lett* 1996;216:49–52
- 55 Takeo Y. Influence of continuous illumination on estrous cycle of rats: time course of changes in levels of gonadotropins and ovarian steroids until occurrence of persistent estrus. *Neuroendocrinology* 1984;39:97–104
- 56 Canal-Corretger MM, Cambras T, Vilaplana J, ez-Noguera A. Bright light during lactation alters the functioning of the circadian system of adult rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000;278:R201–8
- 57 Cambras T, Vilaplana J, Torres A, et al. Constant bright light (LL) during lactation in rats prevents arrhythmicity due to LL. *Physiol Behav* 1998;63:875–82
- 58 Canal-Corretger MM, Cambras T, ez-Noguera A. Effect of light during lactation on the phasic and tonic responses of the rat pacemaker. *Chronobiol Int* 2003;20:21–35
- 59 Vilaplana J, Madrid JA, Sanchez-Vazquez J, Campuzano A, Cambras T, ez-Noguera A. Influence of period length of light/dark cycles on the body weight and food intake of young rats. *Physiol Behav* 1995;58:9–13
- 60 Zhang BL, Zannou E, Sannajust F. Effects of photoperiod reduction on rat circadian rhythms of BP, heart rate, and locomotor activity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000;279:R169–78
- 61 van den Buuse M. Circadian rhythms of blood pressure and heart rate in conscious rats: effects of light cycle shift and timed feeding. *Physiol Behav* 1999;68:9–15
- 62 Azar TA, Sharp JL, Lawson DM. Effect of housing rats in dim light or long nights on heart rate. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2008;47:25–34
- 63 ARRP Guideline 20. Guideline for housing rats in scientific institutions (<http://www.animaethics.org.au/policies-and-guidelines/animal-care>)
- 64 Amir S, Stewart J. Conditioning in the circadian system. *Chronobiol Int* 1998;15:447–56
- 65 Amir S, Stewart J. The effectiveness of light on the circadian clock is linked to its emotional value. *Neuroscience* 1999;88:339–45
- 66 Gamble MR. Sound and its significance for laboratory animals. *Biol Rev Camb Philos Soc* 1982;57:395–421
- 67 Voipio HM. How do rats react to sound? *Scand J Lab Anim Sci* 1997;24(Suppl. 1):1–80
- 68 Turner JG, Parrish JL, Hughes LF, Toth LA, Caspary DM. Hearing in laboratory animals: strain differences and nonauditory effects of noise. *Comp Med* 2005;55:12–23
- 69 Burn CC. What is it like to be a rat? Rat sensory perception and its implications for experimental design and rat welfare. *Appl Anim Behav Sci* 2008;112:1–32
- 70 Pfaff J. Noise as an environmental problem in the animal house. *Lab Anim* 1974;8:347–54
- 71 Bjork E, Nevalainen T, Hakumaki M, Voipio HM. R-weighting provides better estimation for rat hearing sensitivity. *Lab Anim* 2000;34:136–44
- 72 Kelly JB, Masterton B. Auditory sensitivity of the albino rat. *J Comp Physiol Psychol* 1977;91:930–6
- 73 Brown AM, Pye JD. Auditory sensitivity at high frequencies in mammals. *Adv Comp Physiol Biochem* 1975;6:1–73
- 74 Gourevitch G, Hack MH. Audibility in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 1966;62:289–91
- 75 Borg E. Auditory thresholds in rats of different age and strain. A behavioral and electrophysiological study. *Hear Res* 1982;8:101–15
- 76 Heffner HE, Heffner RS, Contos C, Ott T. Audiogram of the hooded Norway rat. *Hear Res* 1994;73:244–7
- 77 Backoff PM, Caspary DM. Age-related changes in auditory brainstem responses in Fischer 344 rats: effects of rate and intensity. *Hear Res* 1994;73:163–72
- 78 Geal-Dor M, Freeman S, Li G, Sohmer H. Development of hearing in neonatal rats: air and bone conducted ABR thresholds. *Hear Res* 1993;69:236–42
- 79 Lenoir M, Pujol R. Sensitive period to acoustic trauma in the rat pup cochlea. Histological findings. *Acta Otolaryngol* 1980;89:317–22
- 80 Lenoir M, Bock GR, Pujol R. Supra-normal susceptibility to acoustic trauma of the rat pup cochlea. *J Physiol (Paris)* 1979;75:521–4
- 81 Coleman J, Blatchley BJ, Williams JE. Development of the dorsal and ventral cochlear nuclei in rat and effects of acoustic deprivation. *Brain Res* 1982;256:119–23
- 82 Poon PW, Chen X. Postnatal exposure to tones alters the tuning characteristics of inferior collicular neurons in the rat. *Brain Res* 1992;585:391–4
- 83 Blanchard RJ, Blanchard DC, Agullana R, Weiss SM. Twenty-two kHz alarm cries to presentation of a predator, by laboratory rats living in visible burrow systems. *Physiol Behav* 1991;50:967–72
- 84 Anisko JJ, Suer SF, McClintock MK, Adler NT. Relation between 22-kHz ultrasonic signals and sociosexual behavior in rats. *J Comp Physiol Psychol* 1978;92:821–9
- 85 Sales GD. Ultrasound and aggressive behaviour in rats and other small mammals. *Anim Behav* 1972;20:88–100
- 86 Haney M, Miczek KA. Ultrasounds during agonistic interactions between female rats (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol* 1993;107:373–9
- 87 Barfield RJ, Geyer LA. Sexual behavior: ultrasonic postejaculatory song of the male rat. *Science* 1972;176:1349–50
- 88 White NR, Barfield RJ. Effects of male pre-ejaculatory vocalizations on female receptive behavior in the rat (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol* 1990;104:140–6
- 89 Matochik JA, White NR, Barfield RJ. Variations in scent marking and ultrasonic vocalizations by Long-Evans rats across the estrous cycle. *Physiol Behav* 1992;51:783–6
- 90 Brown RE. The 22-kHz pre-ejaculatory vocalizations of the male rat. *Physiol Behav* 1979;22:483–9

- 91 Lewis PR, Schriefer JA. Ultrasound production by pregnant rats. *Behav Neural Biol* 1982;35:422-5
- 92 Ihnat R, White NR, Barfield RJ. Pup's broadband vocalizations and maternal behavior in the rat. *Behav Processes* 1995;33:257-71
- 93 Burman OHP, Ilyat A, Jones G, Mendl M. Ultrasonic vocalizations as indicators of welfare for laboratory rats (*Rattus norvegicus*). *Appl Anim Behav Sci* 2007;104:116-29
- 94 Brudzynski SM, Ociepa D. Ultrasonic vocalization of laboratory rats in response to handling and touch. *Physiol Behav* 1992;52:655-60
- 95 Jourdan D, Ardid D, Chapuy E, Eschaliér A, Le BD. Audible and ultrasonic vocalization elicited by single electrical nociceptive stimuli to the tail in the rat. *Pain* 1995;63:237-49
- 96 Levine JD, Feldmesser M, Tecott L, Gordon NC, Izdebski K. Pain-induced vocalization in the rat and its modification by pharmacological agents. *Brain Res* 1984;296:121-7
- 97 Kaltwasser MT. Startle-inducing acoustic stimuli evoke ultrasonic vocalization in the rat. *Physiol Behav* 1990;48:13-17
- 98 Peterson EA. Noise and laboratory animals. *Lab Anim Sci* 1980;30:422-39
- 99 Fletcher JL. Influence of noise on animals. In: McSheehy T, ed. *Control of the Animal House Environment. Laboratory Animal Handbook 7*. Huntingdon, UK: Laboratory Animals Ltd, 1976:51-62
- 100 Popelar J, Groh D, Pelanova J, Canlon B, Syka J. Age-related changes in cochlear and brainstem auditory functions in Fischer 344 rats. *Neurobiol Aging* 2006;27:490-500
- 101 Keithley EM, Lo J, Ryan AF. 2-Deoxyglucose uptake patterns in response to pure tone stimuli in the aged rat inferior colliculus. *Hear Res* 1994;80:79-85
- 102 Bevan W. Sound-precipitated convulsions 1947-1954. *Psychol Bull* 1955;52:473-504
- 103 D'Amour FE, Shaklee AB. Effect of audiogenic seizures on adrenal weight. *Am J Physiol* 1955;183:269-71
- 104 Duncan IW. The effect of audiogenic seizures in rats on the adrenal weight, ascorbic acid, cholesterol, and corticosteroids. *J Biol Chem* 1957;229:563-8
- 105 Boyle E, Villanueva PA. Hyperbaric oxygen seizures in rats: effects of handling and chamber noise. *Lab Anim Sci* 1976;26:100-1
- 106 Ross KC, Coleman JR. Audiogenic seizures in the developmentally primed Long-Evans rat. *Dev Psychobiol* 1999;34:303-13
- 107 Alario P, Gamallo A, Beato MJ, Tranco G. Body weight gain, food intake and adrenal development in chronic noise stressed rats. *Physiol Behav* 1987;40:29-32
- 108 Nayfield KC, Besch EL. Comparative responses of rabbits and rats to elevated noise. *Lab Anim Sci* 1981;31:386-90
- 109 Morseth SL, Dengerink HA, Wright JW. Effect of impulse noise on water consumption and blood pressure in the female rat. *Physiol Behav* 1985;34:1013-16
- 110 Borg E, Moller AR. Noise and blood pressure: effect of lifelong exposure in the rat. *Acta Physiol Scand* 1978;103:340-2
- 111 Armario A, Castellanos JM, Balasch J. Adaptation of anterior pituitary hormones to chronic noise stress in male rats. *Behav Neural Biol* 1984;41:71-6
- 112 Armario A, Castellanos JM. Effect of acute and chronic stress on testosterone secretion in male rats. *J Endocrinol Invest* 1984;7:659-61
- 113 Barrett AM, Stockham MA. The effect of housing conditions and simple experimental procedures upon the corticosterone level in the plasma of rats. *J Endocrinol* 1963;26:97-105
- 114 Burow A, Day HE, Campeau S. A detailed characterization of loud noise stress: intensity analysis of hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis and brain activation. *Brain Res* 2005;1062:63-73
- 115 Zondek B. Effect of auditory stimuli on female reproductive organs. *Trans N Engl Obstet Gynecol Soc* 1964;18:177-85
- 116 Rabat A, Bouyer JJ, Aran JM, Courtiere A, Mayo W, Le MM. Deleterious effects of an environmental noise on sleep and contribution of its physical components in a rat model. *Brain Res* 2004;1009:88-97
- 117 Rabat A, Bouyer JJ, Aran JM, Le MM, Mayo W. Chronic exposure to an environmental noise permanently disturbs sleep in rats: inter-individual vulnerability. *Brain Res* 2005;1059:72-82
- 118 Friedman M, Byers SO, Brown AE. Plasma lipid responses of rats and rabbits to an auditory stimulus. *Am J Physiol* 1967;212:1174-8
- 119 Lenzi P, Frenzilli G, Gesi M, et al. DNA damage associated with ultrastructural alterations in rat myocardium after loud noise exposure. *Environ Health Perspect* 2003;111:467-71
- 120 Pellegrini A, Soldani P, Gesi M, Lenzi P, Natale G, Paparelli A. Effect of varying noise stress duration on rat adrenal gland: an ultrastructural study. *Tissue Cell* 1997;29:597-602
- 121 Frenzilli G, Lenzi P, Scarcelli V, et al. Effects of loud noise exposure on DNA integrity in rat adrenal gland. *Environ Health Perspect* 2004;112:1671-2
- 122 Sales GD. The effect of 22 kHz calls and artificial 38 kHz signals on activity in rats. *Behav Processes* 1991;24:83-93
- 123 Weyers P, Janke W, Macht M, Weijers H-G. Social and non-social open field behaviour of rats under light and noise stimulation. *Behav Processes* 1994;31:257-67
- 124 Lai H. Acute exposure to noise affects sodium-dependent high-affinity choline uptake in the central nervous system of the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1987;28:147-51
- 125 Prior H. Effects of the acoustic environment on learning in rats. *Physiol Behav* 2006;87:162-5
- 126 Milligan SR, Sales GD, Khirnykh K. Sound levels in rooms housing laboratory animals: an uncontrolled daily variable. *Physiol Behav* 1993;53:1067-76
- 127 Sales GD, Wilson KJ, Spencer KE, Milligan SR. Environmental ultrasound in laboratories and animal houses: a possible cause for concern in the welfare and use of laboratory animals. *Lab Anim* 1988;22:369-75
- 128 Sales GD, Milligan SR, Khirnykh K. Sources of sound in the laboratory animal environment: a survey of the sounds produced by procedures and equipment. *Anim Welf* 1999;8:97-115
- 129 Voipio HM, Nevalainen T, Halonen P, Hakumaki M, Bjork E. Role of cage material, working style and hearing sensitivity in perception of animal care noise. *Lab Anim* 2006;40:400-9
- 130 Pfaff J, Stecker M. Loudness level and frequency content of noise in the animal house. *Lab Anim* 1976;10:111-17
- 131 Nunez MJ, Mana P, Linares D, et al. Music, immunity and cancer. *Life Sci* 2002;71:1047-57
- 132 Clough G, Fasham JA. A 'silent' fire alarm. *Lab Anim* 1975;9:193-6
- 133 Armario A, Montero JL, Balasch J. Sensitivity of corticosterone and some metabolic variables to graded levels of low intensity stresses in adult male rats. *Physiol Behav* 1986;37:559-61
- 134 Armario A, Lopez-Calderon A, Jolin T, Castellanos JM.

- Sensitivity of anterior pituitary hormones to graded levels of psychological stress. *Life Sci* 1986;39:471–5
- 135 Balcombe JP, Barnard ND, Sandusky C. Laboratory routines cause animal stress. *Contemp Top Lab Anim Sci* 2004;43:42–51
- 136 Gartner K, Buttner D, Dohler K, Friedel R, Lindena J, Trautschold I. Stress response of rats to handling and experimental procedures. *Lab Anim* 1980;14:267–74
- 137 De Boer SF, Koopmans SJ, Slangen JL, Van der Gugten J. Plasma catecholamine, corticosterone and glucose responses to repeated stress in rats: effect of interstressor interval length. *Physiol Behav* 1990;47:1117–24
- 138 Flecknell PA. *Laboratory Animal Anesthesia: A Practical Introduction for Research Workers and Technicians*. 2nd edn. Newcastle-upon-Tyne: Academic Press, 1996
- 139 Tabata H, Kitamura T, Nagamatsu N. Comparison of effects of restraint, cage transportation, anaesthesia and repeated bleeding on plasma glucose levels between mice and rats. *Lab Anim* 1998;32:143–8
- 140 Saibaba P, Sales GD, Stodulski G, Hau J. Behaviour of rats in their home cages: daytime variations and effects of routine husbandry procedures analysed by time sampling techniques. *Lab Anim* 1996;30:13–21
- 141 Duke JL, Zammit TG, Lawson DM. The effects of routine cage-changing on cardiovascular and behavioral parameters in male Sprague-Dawley rats. *Contemp Top Lab Anim Sci* 2001;40:17–20
- 142 Sharp J, Zammit T, Azar T, Lawson D. Does witnessing experimental procedures produce stress in male rats? *Contemp Top Lab Anim Sci* 2002;41:8–12
- 143 Sharp J, Zammit T, Azar T, Lawson D. Stress-like responses to common procedures in individually and group-housed female rats. *Contemp Top Lab Anim Sci* 2003;42:9–18
- 144 Sharp J, Zammit T, Azar T, Lawson D. Are 'by-stander' female Sprague-Dawley rats affected by experimental procedures? *Contemp Top Lab Anim Sci* 2003;42:19–27
- 145 Sharp JL, Zammit TG, Azar TA, Lawson DM. Stress-like responses to common procedures in male rats housed alone or with other rats. *Contemp Top Lab Anim Sci* 2002;41:8–14
- 146 Sharp JL, Zammit TG, Lawson DM. Stress-like responses to common procedures in rats: effect of the estrous cycle. *Contemp Top Lab Anim Sci* 2002;41:15–22
- 147 Van Loo PLP, Kruitwagen CLJJ, Van Zutphen LFM, Koolhaas JM, Baumans V. Modulation of aggression in male mice: influence of cage cleaning regime and scent marks. *Anim Welf* 2000;9:281–95
- 148 Burn CC, Peters A, Day MJ, Mason GJ. Long-term effects of cage-cleaning frequency and bedding type on laboratory rat health, welfare, and handleability: a cross-laboratory study. *Lab Anim* 2006;40:353–70
- 149 Burn CC, Peters A, Mason GJ. Acute effects of cage cleaning at different frequencies on laboratory rat behaviour and welfare. *Anim Welf* 2006;15:161–71
- 150 Harkness JE, Ridgway MD. Chromodacryorrhea in laboratory rats (*Rattus norvegicus*): etiologic considerations. *Lab Anim Sci* 1980;30: 841–4
- 151 de Laat JM, Van Tintelen G, Beynen AC. Transportation of rats affects behaviour of non-transported rats in the absence of physical contact (preliminary communication). *Z Versuchstierkd* 1989;32:235–7
- 152 Dallmann R, Steinlechner S, von Hörsten S, Karl T. Stress-induced hyperthermia in the rat: comparison of classical and novel recording methods. *Lab Anim* 2006;40:186–93
- 153 Blanchard DC, Griebel G, Blanchard RJ. Conditioning and residual emotionality effects of predator stimuli: some reflections on stress and emotion. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003;27:1177–85
- 154 Komori T, Miyahara S, Yamamoto M, et al. Effects of odorants on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and interleukin-6 (IL-6) and IL-6 receptor mRNA expression in rat hypothalamus after restraint stress. *Chem Senses* 2003;28:767–71
- 155 Nakashima T, Akamatsu M, Hatanaka A, Kiyohara T. Attenuation of stress-induced elevations in plasma ACTH level and body temperature in rats by green odor. *Physiol Behav* 2004;80:481–8
- 156 Broderson JR, Lindsey JR, Crawford JE. The role of environmental ammonia in respiratory mycoplasmosis of rats. *Am J Pathol* 1976;85:115–30
- 157 Gamble MR, Clough G. Ammonia build-up in animal boxes and its effect on rat tracheal epithelium. *Lab Anim* 1976;10:93–104
- 158 Silverman J, Bays DW, Baker SP. Ammonia and carbon dioxide concentrations in disposable and reusable static mouse cages. *Lab Anim (NY)* 2009;38:16–23
- 159 Reeb-Whitaker CK, Paigen B, Beamer WG, et al. The impact of reduced frequency of cage changes on the health of mice housed in ventilated cages. *Lab Anim* 2001;35:58–73
- 160 Lipman NS. Isolator rodent caging systems (state of the art): a critical view. *Contemp Top Lab Anim Sci* 1999;38:9–17
- 161 Krohn TC, Hansen AK, Dragsted N. The impact of cage ventilation on rats housed in IVC systems. *Lab Anim* 2003;37:85–93
- 162 Baumans V, Schlingmann F, Vonck M, van Lith HA. Individually ventilated cages: beneficial for mice and men? *Contemp Top Lab Anim Sci* 2002;41:13–19
- 163 Meijer MK. *Neglected Impact of Routine: Refinement of Experimental Procedures in Laboratory Mice* (PhD thesis). Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, 2006