

Edición en Español de:
Laboratory Animals Volume 44 April 2010

Laboratory Animals

THE INTERNATIONAL JOURNAL OF
LABORATORY ANIMAL SCIENCE AND WELFARE

Métodos de identificación en ratones C57BL/6 recién nacidos: Evaluación de su desarrollo y comportamiento

M J Castelhana-Carlos¹, N Sousa¹, F Ohl² y V Baumans²

¹Instituto de investigação em Ciências da Vida e Saúde (ICVS), Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Minho, 4710-057 Braga, Portugal; ²División de Ciencia del Animal de Laboratorio, Departamento de Animales, Ciencia y Sociedad, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Utrecht, 3584 CM Utrecht, Países Bajos

Autor para correspondencia: M J Castelhana-Carlos. Email: mjoao@ecsau.de.uminho.pt

Este artículo ha sido traducido por: Dra. 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.

Métodos de identificación en ratones C57BL/6 recién nacidos: Evaluación de su desarrollo y comportamiento

M J Castelhana-Carlos¹, N Sousa¹, F Ohl² y V Baumans²

¹Instituto de investigação em Ciências da Vida e Saúde (ICVS), Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Minho, 4710-057 Braga, Portugal; ²División de Ciencia del Animal de Laboratorio, Departamento de Animales, Ciencia y Sociedad, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Utrecht, 3584 CM Utrecht, Países Bajos

Autor para correspondencia: M J Castelhana-Carlos. Email: mjoao@eccsaude.uminho.pt

Resumen

El uso en muchos campos de la investigación biomédica de roedores alojados en grupo plantea la necesidad de identificar a los individuos en una cubeta. Muy pocos estudios se han diseñado con el objetivo de evaluar los posibles efectos negativos de los métodos de identificación de ratones recién nacidos sobre su desarrollo y bienestar. En el presente estudio, se aplicaron tres métodos de identificación a ratones C57BL/6J recién nacidos en el día 5 postnatal (amputación de falanges, tatuaje de las falanges e implante subcutáneo de un pequeño transmisor). Todos los métodos de identificación empleados probaron ser efectivos para el marcado individual de animales, a largo plazo. Los ratones recién nacidos mostraron una menor reacción a la amputación de falanges, seguida del tatuaje de falanges, mientras que la implantación del transmisor demostró ser la técnica de identificación individual más dolorosa en ratones recién nacidos. Es importante notar que el tejido amputado de las falanges fue suficiente para el genotipado. Por lo general no se apreciaron diferencias consistentes en el desarrollo de reflejos somáticos o neurológicos durante el periodo postnatal como resultado de los procedimientos de identificación individual empleados en los recién nacidos. Además, ninguno de los métodos interfirió significativamente con el comportamiento normal general de los animales adultos (por ejemplo la capacidad de moverse, sujetar, trepar) ni con las funciones sensoriomotrices evaluadas con una serie de test SHIRPA simplificados, así como con test Rotarod y de laberinto en cruz elevado (*Elevated Plus Maze*). El peso post mortem del timo y las glándulas suprarrenales no indicaba estrés crónico como consecuencia del método de investigación. Nuestra conclusión es que la amputación de falanges puede ser incluso recomendable en ratones recién nacidos de muy corta edad, cuando es necesario el genotipado. El tatuaje de las falanges también es un buen método de identificación para ratones recién nacidos y la implantación de transmisores debería usarse solamente en recién nacidos de mayor edad o durante el destete.

Palabras clave: identificación, marcado, bienestar, desarrollo, comportamiento

Laboratory Animals 2010; 44: 88–103. DOI: 10.1258/la.2009.009044

Los roedores, en especial los ratones y ratas, son los animales que se usan con más frecuencia para la investigación biomédica. Ya que se alojan en grupos, es a menudo necesario identificar a miembros del grupo para diferenciar a individuos que se empleen para la cría, como fuente de tejidos, células o fluidos, y con el objeto de mantener informes de salud y gestionar apropiadamente las colonias de animales de laboratorio de acuerdo con las regulaciones y requerimientos de los protocolos de investigación.^{1,2}

La elección del mejor método de identificación animal depende de varios factores, incluyendo la especie, duración del estudio, edad y pigmentación de la piel del animal, y la experiencia técnica de la que se dispone. El método de identificación ideal debería no sólo proporcionar identificación individual efectiva y ser de fácil aplicación técnica, sino que también debería evitar ser la causa de dolor y/o sufrimiento. El seguimiento individual de ratones alojados en grupo puede ser necesario desde su nacimiento, por ejemplo

cuando se monitoriza su desarrollo al llevar a cabo el fenotipado de un nuevo modelo de ratón o al estudiar los efectos del estrés en la primera etapa de vida de animales recién nacidos. Los métodos tradicionales de identificación individual permanente que pueden usarse con ratones recién nacidos incluyen la amputación de falanges^{3,4} y el tatuado de cuerpo, cola o patas.⁵⁻⁷

La amputación de falanges ha estado muy extendida en el pasado, pero en la actualidad no se recomienda por razones éticas y de bienestar.^{1,8,9} Las recomendaciones y pautas indican que la amputación de falanges es un método aceptable sólo para neonatos altriciales (\leq día 7 postnatal), cuando ningún otro método es viable^{9,10}, y varios Comités Institucionales para el Cuidado y Uso Animal (*Institutional Animal Care and Use Committees*, IACUC en sus siglas en inglés) sólo permiten la amputación de falanges cuando se presenta una significativa justificación científica.¹¹⁻¹⁵

La amputación de falanges se puede practicar a ratones recién nacidos apenas un día después de su nacimiento, pero es más fácil de practicar entre los días 5 y 7 postnatales, cuando los dedos son más largos pero la osificación aún no se ha completado.¹⁶ Una ventaja de la amputación de falanges es que el tejido amputado puede usarse para extraer ADN y para el genotipado, lo que resulta de particular utilidad en el estudio de transgenes y/o mutaciones que requieran ser analizados en la primera fase del periodo postnatal.¹⁷

La identificación de ratones recién nacidos mediante micro-tatuado también puede practicarse desde el primer día postnatal y es relativamente fácil, pero puede requerir equipamiento específico (una pistola de tatuaje eléctrica) y personal entrenado adecuadamente que sea capaz de tatuar números o marcas muy pequeños en la cola o patas del ratón causándole el mínimo sufrimiento posible. También está disponible un sistema más simple que utiliza una aguja de calibre fino llena de tinta para tatuar con la que se inyectan pequeños puntos de tinta en la pata, pie o dedo del animal¹⁸ (http://www.ketchum.ca/pages/lab_animals/lab1.htm). La identificación mediante tatuaje puede resultar difícil de discernir en ratones jóvenes pigmentados, pero su visibilidad aumenta con el crecimiento del animal.

Los transmisores de implantación subcutánea (microchips) que usan un sistema de identificación

por radiofrecuencia se usan de forma rutinaria desde principios de los años 80 (Bio Medic DataSystems, Inc: <http://www.bmds.com/main.cfm>) para identificar a ratones de laboratorio en estudios de toxicidad y de carcinógenos. Por lo general, los transmisores tienen unos 2 mm de diámetro y 12-14 mm de longitud, y su uso no se aplica a animales antes del día 8-10 postnatal o que pesen menos de 5g (véase ejemplo¹⁹). Recientemente, Lutronic International (<http://www.lutronic.eu/>) ha lanzado un microchip de menor tamaño como método de identificación aplicable a ratones unos pocos días después de su nacimiento (http://www.rfcafe.com/miscellany/press_releases/2007/lutronic_intl_6-11-2007.htm). Los animales con un transmisor implantado pueden ser identificados sin manipularse ni sacarse de su cubeta, y al final del experimento el microchip puede conservarse con los tejidos fijados que se han extirpado al animal para su identificación permanente.²⁰

El uso de transmisores también presenta la ventaja de permitir el registro de datos en un sistema de seguimiento computarizado, lo que es de gran utilidad para la gestión de colonias y para la creación de bases de datos de investigación, evitando errores en el registro y transcripción de datos. El desarrollo de microchips para implante que identifiquen al animal y a la vez permitan recolectar información fisiológica (por ejemplo la temperatura corporal) sin molestar al animal constituye otra ventaja de esta técnica de identificación.^{19, 21} Sin embargo, este método de identificación requiere equipamiento específico y transmisores que pueden ser costosos, a pesar de que puedan reutilizarse.

Al igual que otros procedimientos que se practiquen a los animales de laboratorio, las técnicas de identificación no deberían causar dolor y/o sufrimiento que pudieran interferir en el bienestar animal y los resultados experimentales, ya que el bienestar animal y los resultados científicos fiables están unidos de forma inextricable.²² Por lo tanto, es importante conocer los posibles efectos de la aplicación de métodos de identificación al usarse a ratones a una edad muy temprana. La amputación de falanges es una técnica muy controvertida y su justificación ética se ha debatido recientemente, ya que este método de identificación es con frecuencia doloroso y puede afectar a la capacidad del ratón para sujetar, acicalarse y alimentarse, así como alterar su modo de andar.^{2,9} Los informes indican que tatuar el

cuerpo (piel del dorso) de los ratones recién nacidos durante las primeras 24 horas tras su nacimiento no aumenta la mortalidad ni el canibalismo⁵⁻⁷ y los autores sólo han sugerido que puede haber efectos negativos menores a corto plazo en el bienestar en un estudio que empleó ratones C57BL/6JBomTac tatuados en la cola en los días 4, 12 y 20 postnatales. Es importante notar que no se apreciaron diferencias en el crecimiento o emocionalidad de estos animales.²³ Tampoco se vieron afectados el crecimiento, madurez o capacidad reproductiva de ratones y ratas identificados individualmente a través de tatuado de la palma.²⁴ En el caso de los transmisores, se ha sugerido que un efecto negativo en ratones puede ser una posible interferencia con el movimiento y postura.⁹ También se ha informado en estudios de carcinógenos a largo plazo del desarrollo de sarcomas asociados a microchips en ratones adultos a los que se les había implantado durante su juventud/edad adulta (durante o después del destete).^{20,25,26}

Se han diseñado pocos estudios sistemáticos para comparar directamente los posibles efectos negativos de los métodos de identificación en ratones recién nacidos. En el presente estudio, hemos llevado a cabo una evaluación comprensiva de las consecuencias de tres métodos de identificación en ratones recién nacidos (amputación de falanges, tatuaje de las falanges e implantación subcutánea de un pequeño transmisor). Hemos evaluado cuál de estos métodos es más fácil de aplicar y más fiable, y cuál causaría menos dolor y sufrimiento al recién nacido. Además, hemos verificado la viabilidad de usar pequeños transmisores de reciente desarrollo para la identificación a largo plazo de ratones recién nacidos. Para evaluar el impacto de la experiencia dolorosa/estresante y/o del daño físico causado por el proceso de identificación en el desarrollo normal de los animales, hemos medido la condición morfológica, los reflejos y la capacidad sensorial desde el día 5 postnatal hasta el destete (desarrollo neonatal neurocomportacional). El comportamiento y las capacidades motrices de los animales adultos, a los que se había practicado un procedimiento de identificación el día 5 postnatal, fueron evaluadas midiendo el comportamiento trepador y usando una serie de test SHIRPA simplificados, así como con test Rotarod y laberinto en cruz elevado.

En este estudio hemos utilizado la cepa de ratón C57BL/6J, una cepa endogámica comúnmente empleada para la producción de animales

genéticamente modificados y ampliamente utilizada en la investigación biomédica.

Animales, materiales y métodos

Animales

Se adquirieron ratones C57BL/6J, 9 machos y 18 hembras de siete semanas de edad, libres de patógenos específicos, en los laboratorios Charles River Laboratories, Francia, y se mantuvieron durante una semana en cuarentena, después de lo que se transfirieron a una sala de mantenimiento convencional donde se emplearon para cría a la edad de 11 semanas (1 macho x 2 hembras, por cubeta). El día después del apareamiento se examinó a las hembras en busca de tapones vaginales y a continuación se las pesó dos veces a la semana para confirmar la preñez. Los machos se retiraron de las cubetas tan pronto como esta estuvo confirmada. Las crías nacieron en los días de gestación 20-21 (contando el día de la detección del tapón como el día 0 de la gestación) y el día del nacimiento se consideró el día 0 postnatal. Las crías fueron destetadas en el día 21 postnatal y alojadas en grupos de 4-5 de acuerdo a su género. Los compañeros de camada se distribuyeron aleatoriamente en cubetas de acuerdo con su día de nacimiento, compartiendo cubeta con animales entre los que no hubiera más de 2-3 días de diferencia de edad.

Se mantuvo a todos los animales bajo condiciones de laboratorio estándar: ciclo artificial de 12 horas de luz/oscuridad (luces encendidas desde las 08:00 hasta las 20:00), a una temperatura ambiente de $21 \pm 1^\circ\text{C}$ y una humedad relativa del 50-60%; se los alojó en cubetas transparentes con tapa de filtro 267 x 207 x 140 mm (370 cm^2 área de suelo) (Tecniplast, Buguggiate, Italia), con lecho de mazorca de maíz (Scobis Due, Mucedola SRL, Settimo Milanese, Italia) y material para nido (papel esterilizado en autoclave); se administró a los ratones una dieta estándar (4RF25 durante la gestación y la etapa postnatal, y 4RF21 después del destete; Mucedola SRL) y agua *ad libitum*. El control de la salud se hizo siguiendo las pautas de FELASA²⁷, confirmando la ausencia de patógenos en animales centinela que se mantuvieron en la misma sala.

Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con las regulaciones europeas (Directiva de la Unión Europea 86/609/CEE).

Métodos de identificación permanente en recién nacidos

Un total de 78 animales (39 hembras y 39 machos) de 17 camadas diferentes se asignaron de forma aleatoria a cuatro grupos experimentales según el género: tres grupos dedicados a probar tres métodos diferentes de identificación permanente: *Amputación de falanges* – 22 animales (11 hembras y 11 machos); *Tatuaje de falanges* – 20 animales (10 hembras y 10 machos); *Transmisor* – 16 animales (8 hembras y 8 machos) y el grupo de *Control* – 20 animales (10 hembras y 10 machos).

El experimento comenzó en el día 5 postnatal. Para evitar un periodo largo de manipulación de los recién nacidos, los métodos de identificación, descritos a continuación, se practicaron lo más rápido posible. Tras la reacción inmediata de los recién nacidos al procedimiento de identificación, se observaron movimientos repentinos y se registraron la presencia o ausencia de vocalización y micción como indicadores de dolor/sufrimiento.²⁸

Amputación de falanges (grupo amputación de falanges)

Se sostuvo al recién nacido cuidadosamente con una mano sobre una superficie suave, y se limpió su pata con una solución de etanol del 70% extendiéndose entre el pulgar y el índice. A continuación se amputó uno de los dedos en una pata por animal, con tijeras finas (cat. # 14060-10, Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Alemania), amputando la parte distal del dedo (aproximadamente 1/3, equivalente a la primera falange). A cada uno de los animales se le amputó un dedo diferente en una de las cuatro patas. Se empleó una técnica aséptica, y el tejido del dedo amputado a los recién nacidos se conservó en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml a 4°C que se mantuvieron a -20°C para la extracción de ADN.

Tatuaje de falanges (grupo tatuaje de falanges)

Se sostuvo al recién nacido cuidadosamente, de modo similar al empleado con la amputación de falanges, la pata se limpió con una solución de etanol del 70%, y se empleó una aguja de 30G, que previamente se había sumergido en tinta para tatuar animales (green paste, Ketchum Manufacturing Inc, Canadá) para hacer una punción en un dedo diferente de cada una de las cuatro patas de cada animal. La aguja cargada de tinta se insertó en la capa superficial de la piel y se introdujo 1-1,5mm en paralelo a la superficie de la piel siguiendo

la longitud del dedo. Para evitar que la tinta se saliera del dedo, se dejó la aguja insertada durante 2-3 segundos, después de lo cual se extrajo con suavidad.

Implantación de transmisor (grupo transmisor)

Se colocó al recién nacido en una toalla de papel limpia, con las cuatro extremidades hacia abajo, y se lo sostuvo entre el pulgar y el índice. Primero se limpió la piel dorsal en la parte de atrás del cuello (área de inyección) del recién nacido con un algodón previamente sumergido en una solución de etanol del 70%. Se insertó de forma subcutánea la punta de la aguja estéril 18G que contenía el transmisor identificador (1mm de diámetro, 6mm de longitud y 7,15mg de peso) (NONA06VT02-B, NONATEC™, amablemente proporcionados por Lutronic International, Rodange, Luxemburgo), en la parte de atrás del cuello y se inyectó el transmisor. Se retiró la aguja cuidadosamente para no retirar el transmisor del animal y se usaron fórceps para masajear suavemente el transmisor bajo la piel dorsal del animal, lateralmente y después caudalmente. Después de haber perdido algunos transmisores en procedimientos anteriores, fue necesario masajear el transmisor hacia atrás y hacia los lados para evitar que la madre lo retirase de la cría lamiendo el área de inyección. Un lector/escritor específico (NONATEC V1, puerto USB) se usó para detectar el código del transmisor con ayuda del software Nonatec PRO V1.2 (NONATEC™, amablemente proporcionado por Lutronic International).

Controles inyectados (grupo control)

Los animales de control inyectados se manipularon e inyectaron subcutáneamente con una aguja 18G de forma similar a como se hizo para la inyección de transmisores subcutáneos.

Extracción genómica de ADN del tejido del dedo

Las muestras de tejido conservadas a -20°C se descongelaron a temperatura ambiente y se les añadieron 15µl de solución amortiguadora ATL (solución amortiguadora de lisis de tejidos, cat. # 19076, Qiagen; Izasa, Lisboa, Portugal) y 10ml de proteasa K, a 14–22 mg/ml en 10mmol/L Tris-HCl, pH 7.5 (cat. # 03 115 828 001, Roche Applied Science; Roche, Lisboa, Portugal). El preparado se mezcló en el vortex y se incubó a 55°C durante la noche para la digestión del tejido. A continuación se desactivó la proteasa K a 98°C durante 10 minutos; se añadieron 100µl de solución para precipitación de proteínas (cat. # PP-350, Cytogen; Citomed, Lisboa, Portugal) a cada

tubo, para ser después agitado y centrifugado a 13000 rpm. A continuación el líquido sobrenadante se transfirió a nuevos tubos de microcentrifuga de 1,5ml que contenían 200µl de alcohol isopropílico para la precipitación del ADN. Después de dar la vuelta varias veces a los tubos, se sometió a las muestras a 10 minutos de centrifugación a 13000 rpm. El líquido sobrenadante fue desechado y el pellet de ADN se lavó con 200µl de etanol del 70% dando la vuelta a los tubos varias veces con cuidado, después de lo cual se centrifugaron durante un minuto a 13000 rpm. La solución de etanol se retiró cuidadosamente y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente. Una vez que los pellets de ADN estuvieron secos, se suspendieron en 20µl de solución amortiguadora TE pH8 (10 mmol/L Tris-Cl, pH 8, 1 mmol/L EDTA, pH 8), mezclándolos con ayuda de una micropipeta e incubando las muestras durante una hora a 65°C. La cuantificación del ADN de cada muestra se practicó mediante espectrofotometría (midiendo la densidad óptica a $\lambda = 260\text{nm}$), utilizando NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, LLC, DE, EE.UU.).

Procedimientos de prueba con recién nacidos

Entre los días 0 y 4 postnatales se examinó la apariencia de la piel de los animales, su actividad y la presencia de leche en el estómago (puntos de leche) para confirmar que se estaban alimentando (como un indicador de bienestar^{9,29,30}).

Entre los días postnatales 5 y 21 las cubetas que contenían madres y crías se trasladaron a diario a una sala experimental al inicio del periodo de luz y el mismo experimentador (MJCC) midió todos los parámetros del desarrollo morfológico y reflejos neurológicos, empezando a las 08:30 y seleccionando al azar el orden de las camadas y los animales examinados dentro de cada camada. El experimentador sólo verificó la identificación del animal una vez finalizado el procedimiento. En el día 5 postnatal se llevaron a cabo todos los exámenes antes de aplicar el método de identificación.

Parámetros somáticos

Como medida del desarrollo morfológico, se pesó a los animales en una báscula de precisión para roedores vivos (Explorer Pro, Ohaus), y después, sujetando a la cría con una mano entre el pulgar, el índice y el dedo corazón, con las cuatro extremidades hacia arriba, se midió la distancia anogenital en milímetros, usando

una regla (previamente desinfectada con una solución de etanol del 70%). También se examinó a diario la erupción de los incisivos mientras se sujetaba a los animales, y se observaron otros parámetros mientras las crías se movían libremente sobre una toalla de papel. Se asignó una puntuación de 0 ó 1, respectivamente, a la ausencia o presencia de pelaje, de la erupción de incisivos, de ojos u orejas abiertos.

Reflejos neurológicos

La evaluación de los reflejos neurológicos se llevó a cabo a diario entre los días 5 y 21 postnatales. Se asignó una puntuación de 0 ó 1, respectivamente, a animales que no presentaran o presentaran el reflejo o respuesta madura como se describe a continuación.

Caminar (coordinación locomotriz y fuerza muscular). Se permitió a los recién nacidos desplazarse libremente y se observó el desarrollo de la locomoción durante un minuto. Se consideró como capacidad madura para caminar el que el animal fuese capaz de moverse con el cuerpo completamente sostenido por las cuatro patas sin arrastrar el vientre por la superficie. Se espera una respuesta madura normal en los días 15-16 postnatales.³¹

Sujetar (reflejo de liberación). Se estimuló la palma de una de las patas delanteras del recién nacido con un alambre fino. Se consideró una respuesta madura desde el momento en el que el animal sujetó el alambre inmediatamente. Se espera una respuesta madura normal en los días 8-9 postnatales.³¹

Reflejo de enderezamiento (respuesta postural y liberántica). Los recién nacidos se colocaron boca arriba con las extremidades hacia arriba y se tomó nota del tiempo que necesitaron para darse la vuelta y volver a su posición normal (se establecieron 30 segundos como tiempo máximo). Se asumió que el reflejo se había adquirido completamente cuando los animales eran capaces de rotar 180° inmediatamente sobre su eje longitudinal, sosteniéndose sobre las cuatro extremidades. Se espera una respuesta madura normal en los días postnatales 6-8.³¹

Reflejo postural. Se colocó a los recién nacidos en una pequeña caja de plástico abierta (10x10mm de base y 10mm de altura) y se les movió suavemente de izquierda a derecha y de arriba abajo. Se consideró que aquellos animales que fueron capaces de

mantener su posición original en la caja extendiendo las cuatro extremidades habían adquirido un reflejo postural maduro. Se espera una respuesta madura normal entre los días postnatales 10 y 16.³²

Suspensión de alambre o test de sujeción de barra (fuerza muscular). Se suspendió una barra/alambre metálico de 3mm de diámetro a una altura de 35cm sobre una superficie blanda. Se sostuvo al animal permitiéndole tocar la barra con las patas delanteras, y se observó la capacidad del animal para mantenerse sujeto a ella. La respuesta madura, que se espera en los días 12-13 postnatales,³¹ se consideró como la capacidad del animal de sujetar la barra con las cuatro extremidades (el tiempo máximo establecido fue de 120 segundos).

Test de estabilidad postural y test de movilidad (“geotaxis negativa”) (reacción postural laberíntica). El recién nacido se colocó sobre una rejilla con una inclinación de 45°, con la cabeza dirigida hacia abajo. Se consideró que los animales capaces de rotar 180°, boca arriba, y de trepar por la rejilla en un tiempo límite de 30 segundos, habían adquirido completamente este reflejo. Se espera una respuesta madura normal en los días 6-7 postnatales.³¹

Reflejo de enderezamiento en el aire (respuesta estatocinética laberíntica). Se sostuvo a los ratones recién nacidos boca arriba (con las cuatro extremidades hacia arriba), a 20cm de altura sobre una superficie blanda, y se los dejó caer. Se tomó nota de la posición en la que los animales alcanzaban la superficie blanda. El reflejo se consideró maduro cuando el recién nacido se daba la vuelta durante la caída y aterrizaba sobre las cuatro extremidades. Se puede esperar una respuesta madura a partir de las dos semanas de edad.³³

Procedimientos de prueba con animales adultos

Peso de animales jóvenes/adultos

Después del destete y hasta las 15 semanas de edad se midió el peso de los animales una vez por semana usando una báscula de precisión para roedores vivos (Explorer Pro, Ohaus Corporation, Pine Brook, EE.UU.).

Comportamiento en la cubeta – trepado

La capacidad para trepar se tomó como una medida

del dolor/malestar en los dedos debido a los procedimientos de identificación. A las 10 semanas de edad, se sacó a los animales de la cubeta, se les marcó la cola con un rotulador, se les devolvió a su cubeta que se colocó en la sala experimental y no se les molestó durante 90 minutos. A continuación se registró el comportamiento de los animales en la cubeta durante 12 minutos. La frecuencia y duración del trepado durante un periodo de observación de 10 minutos se puntuó mediante muestreo focal con la ayuda de la herramienta de observación de comportamiento EthoLog (software etho 2.2.5³⁴).

Laberinto en cruz elevado

Este test, que se usa para evaluar la ansiedad, se practicó cuando los animales tenían 11 semanas de edad. Entre las 09:30 y 13:00, bajo condiciones de luz blanca, se colocó a los animales en el centro de una plataforma en forma de cruz elevada 74cm sobre el suelo. El sistema del laberinto estaba formado por dos brazos cerrados (51 x 10 x 40,5cm) y dos brazos abiertos (51 x 10cm) (NIR plus maze, MedAssociates Inc, St Albans, VT, EE.UU.). El test se realizó a los animales durante 5 minutos y se registró online el número de veces que entraban en cada brazo así como el tiempo que permanecían dentro, con la ayuda de un sistema de detección por infrarrojos y de vídeo-seguimiento (MedAssociates Inc). El equipamiento se limpió con una solución de etanol del 10% entre medias de los test. Se analizaron el porcentaje de tiempo que los animales permanecieron en los brazos abiertos y el número de veces que entraron en ellos.

Examen primario SHIRPA simplificado

Se aplicó una versión simplificada del protocolo de examen primario SHIRPA a animales de 12 semanas de edad. Se trata de un exhaustivo protocolo de examen del comportamiento y la morfología en tres fases, desarrollado originalmente por Rogers *et al.* en el Consorcio de la Mutagénesis ENU (*ENU Mutagenesis Consortium*) (formado por SmithKline Beecham Pharmaceuticals, Harwell, MRC Mouse Genome Centre and Mammalian Genetics Unit, Imperial College School of Medicine at St Mary's, Royal London Hospital, St Bartholomew's y la Royal London School of Medicine, Phenotype Assessment)³⁵ y más tarde modificado por otros.³⁶ La serie de test así como los niveles de puntuación respectivos aplicados en el presente estudio se presentan en la Tabla 1. En nuestro protocolo de

examen primario SHIRPA simplificado, evaluamos la función muscular, la función de motoneuronas inferiores y función del tracto espinocerebeloso (actividad espontánea, capacidad motriz, forma de andar, posición y tono corporal y de las extremidades, elevación de la cola, posición visual, manipulación del alambre, reflejo de enderezamiento, equilibrio y coordinación, micción y defecación), función sensorial (agitación por traslado, forma de andar, posición visual, pellizco de los dedos, posición de las extremidades y reflejo de enderezamiento), así como algunas funciones neuropsiquiátricas (agitación por traslado, miedo, actividad espontánea, agresividad, irritabilidad, vocalización y reflejo de enderezamiento) y funciones autónomas (elevación de la cola, micción y defecación).

Después de pesar a los animales, se los trasladó a una plataforma hecha de polimetilmetacrilato transparente de superficie 55cm x 33cm dividida en 15 cuadrados, y se observó la reacción inicial de los animales (agitación por traslado y reacción de miedo). A continuación se dejó al animal libre para moverse en la plataforma y se midió la actividad locomotriz. Sujetando la cola entre el pulgar y el índice, se retiró al animal de la plataforma y se le permitió sujetar un alambre colgante de 3mm, a 35cm de altura de una superficie blanda (*test del alambre colgante*). El *reflejo de enderezamiento* se evaluó sujetando la cola y forzando al animal a darse la vuelta, observando el reflejo del animal de retornar a su posición normal.

Se instalaron sobre la plataforma un alambre de 3mm de diámetro y la rejilla de una cubeta normal para llevar a cabo los test de *manipulación del alambre*, *posición visual*, *posición corporal* (*enroscamiento del tronco*, *agarre de las extremidades*, *sujeción de las extremidades*), *fuerza de agarre* y *pellizco de los dedos*. Para la *manipulación del alambre* se colocó al animal sobre el alambre y se le permitió agarrarlo con las cuatro extremidades. Para la *posición visual*, *enroscamiento del tronco*, *agarre de las extremidades*, y *sujeción de las extremidades* se sostuvo al ratón por la cola entre los dedos índice y pulgar, y se lo aproximó a la superficie de la rejilla horizontal, con la cabeza hacia abajo. Una vez que el animal hubo agarrado la rejilla con las extremidades frontales, se llevó a cabo el test de *pellizco de los dedos* usando fórceps dentados rectos de 10cm de longitud, con extremos de 1mm de diámetro, para pellizcar uno de los dedos de las patas traseras (a la altura de la mitad del dedo). Después se

llevó a cabo un test SHIRPA de "*geotaxis negativa*", para el que se sostuvo al animal por la cola y se le colocó sobre la rejilla horizontal, que inmediatamente después se puso en posición vertical con la cabeza del animal apuntando hacia abajo. Se registró la capacidad para girar 180° y el tiempo necesario para ello, como se describe en la Tabla 1. La *fuerza de agarre* se midió con el animal agarrado a la rejilla con las patas delanteras, mientras se le sostenía por la cola y se tiraba de él con suavidad hacia atrás.

Para el *test de la barra vertical* se colocó al animal en el centro de la barra (40cm de longitud x 2cm de diámetro) que se sostuvo en horizontal a 30cm sobre el suelo y después se puso gradualmente en vertical, con el animal mirando hacia abajo.

Para el test de la *huella* (*evaluación de la forma de caminar*) se pintaron las patas del animal (patas delanteras de rojo y patas traseras de negro) con tinta al agua no tóxica (pasta de témpera, Lefranc & Bourgeois, Francia) y se permitió a los animales caminar por una pista de 70cm de longitud y 4,5cm de ancho cubierta con papel blanco (con paredes de 10cm de altura), inclinada 45°, dentro de una caja oscura. Las huellas se analizaron de acuerdo a cuatro parámetros (todos medidos en cm): la longitud del paso se midió como la media de la distancia del movimiento hacia delante entre cada paso; el ancho de la base de las patas delanteras y traseras se midió de acuerdo a la distancia media entre las huellas derecha e izquierda de las patas delanteras y de las huellas derecha e izquierda de las patas traseras, respectivamente. La distancia entre la huella izquierda o derecha delantera/trasera se utilizó para medir la uniformidad en la alternancia de pasos.

Después de que cada uno de los animales completara el protocolo de examen primario SHIRPA simplificado, se limpió el equipamiento con una solución de etanol del 10%.

Rotarod

Para evaluar la coordinación motriz y el equilibrio, se evaluó a los animales en un aparato rotarod (TSE RotaRod System Advanced, TSE Technical & Scientific Equipment GmbH, Bad Homburg, Alemania) a la edad de 13,5-15 semanas. El día antes del test, se marcó a cada uno de los ratones con rayas en la cola (con un rotulador no tóxico *Sharpie*, Banford®, EE.UU) para facilitar su seguimiento y evaluarlos siempre en el mismo lugar en el aparato rotarod.

El protocolo consistió en tres días de entrenamiento, a una velocidad constante de 15 rpm, durante un periodo máximo de 60 segundos en cuatro pruebas, con un intervalo de 15 minutos entre pruebas. En el cuarto día, se evaluó a los animales de acuerdo a seis velocidades fijadas diferentes (5, 8, 15, 20, 24 y 31 rpm), durante un máximo de 60 segundos en dos pruebas, con un intervalo de 15 minutos entre pruebas. Después se dejó a los animales sin molestarlos en su

cubeta durante 1 hora 30, para después ser sometidos a un protocolo de aceleración continua de 4 a 40 rpm, durante un máximo de 60 segundos en cuatro pruebas (con intervalos de 15 minutos entre medias). Se midió el tiempo que tardaban los animales en caer de la barra. Todos los test se llevaron a cabo entre las 10:00 y las 16:30. El aparato rotarod se limpió con una solución de etanol del 10% entre las pruebas.

Tabla 1: versión simplificada del protocolo de examen primario SHIRPA y sus respectivos sistemas de puntuación y medida

Pruebas	Medidas tomadas y puntuación (cuando sea aplicable)	
<i>Comportamiento medido en la plataforma</i>		
Agitación por traslado	Puntuación de la actividad espontánea	0 = coma; 1 = parálisis prolongada, después movimiento leve; 2 = parálisis larga, después movimiento moderado; 3 = parálisis breve (pocos segundos), después movimiento inmediato; 4 = parálisis momentánea, después movimiento rápido; 5 = no parálisis, movimiento inmediato; 6 = extremadamente agitado (“maniaco”)
	Puntuación del miedo	0 = ninguno; 1 = parálisis durante la agitación por traslado
Tiempo que tarda en empezar a moverse	Tiempo que pasa entre que el ratón empieza a moverse tras caer sobre la plataforma (segundos)	
Actividad locomotriz	Número de cuadrados que pisan las cuatro patas en 30 segundos	0 = normal; 1 = fluido pero anormal; 2 = sólo movimiento limitado; 3 = incapacidad
Comportamiento al caminar	Medición de la manera de caminar	0 = normal; 1 = fluido pero anormal; 2 = sólo movimiento limitado; 3 = incapacidad
	Medición de la elevación de la pelvis	0 = marcadamente baja; 1 = apenas tocando; 2 = normal (elevación de unos 3mm); 3 = elevada (elevación de más de 3mm)
	Medición de la elevación de la cola	0 = arrastrando; 1 = extendida horizontalmente; 2 = cola elevada
<i>Comportamiento medido sobre la plataforma</i>		
Enroscamiento del tronco	Puntuación	0 = ausencia de enroscamiento hacia adelante (de la cabeza al abdomen) del ratón; 1 = presencia de enroscamiento hacia adelante (de la cabeza al abdomen) del ratón
Agarre de las extremidades	Puntuación	0 = ausencia; 1 = presencia
Sujeción de las extremidades	Puntuación	0 = ausencia; 1 = presencia en las extremidades anteriores; 2 = presencia en las extremidades posteriores; 3 = presencia en ambos pares de extremidades
Posición visual	Observar la reacción a la aproximación a la rejilla horizontal (normalmente tendencia a alcanzar y sujetarla)	0 = ausencia; 1 = al entrar en contacto con la nariz; 2 = al entrar en contacto con las vibrisas; 3 = antes del contacto con las vibrisas (18mm); 4 = extensión vigorosa temprana (25mm)
Fuerza de agarre	Puntuación	0 = ninguna; 1 = agarre leve, semi-efectivo; 2 = agarre moderado, efectivo; agarre activo, efectivo; 4 = inusualmente efectivo
Pellizco de los dedos	Puntuación	0 = sin reacción; 1 = retirada leve; 2 = retirada moderada, no brusca; 3 = retirada brusca, rápida; 4 = extensión y flexión repetida, muy brusca
Manipulación de alambre	Puntuación	0 = agarre activo con las patas traseras; 1 = dificultad para agarrar con las patas traseras; 2 = incapaz de agarrar con las patas traseras; 3 = incapaz de levantar las patas traseras, se cae en cuestión de segundos; 4 = se cae inmediatamente

Procedimientos post mortem

Al final del experimento, a las 20 semanas de edad, se sacrificó a los animales mediante decapitación. Las glándulas suprarrenales y el timo se recogieron y pesaron en una báscula analítica (AUW120D, Shimadzu Europe GmbH). Se observó el área de implantación de los transmisores en los animales adultos y estos fueron recuperados.

Análisis estadístico

La información sobre las reacciones de los animales a los procedimientos de identificación, así como la información cualitativa del protocolo SHIRPA simplificado, se analizaron estadísticamente usando un χ^2 test exacto de Fisher, en caso de que fuera pertinente. Se comparó entre grupos el día postnatal mediano en el que los ratones recién nacidos obtenían una puntuación de 1 (presente) respecto a los parámetros de desarrollo físico y adquisición de reflejos. Ya que esta información no estaba distribuida normalmente, se empleó un test Kruskal-Wallis para comparar a los grupos. Se usó un test Mann-Whitney, con corrección Bonferroni, para hacer comparaciones múltiples entre pares de grupos. Se analizaron las curvas de peso, ratio de distancia anogenital/peso, suspensión de alambre, tiempo de reflejo de enderezamiento en superficie y tiempo que tardaban en caer de un rotarod en aceleración, usando un modelo lineal general de valores repetidos de análisis de la varianza (ANOVA). La información cuantitativa obtenida mediante muestreo focal del comportamiento en la cubeta (duración y frecuencia del trepado), laberinto en cruz elevado, protocolo SHIRPA (incluyendo el número de cuadrados en la plataforma y la huella de los pasos) y el peso post mortem de los órganos se analizaron estadísticamente comparando valores medios mediante análisis de la varianza de una vía, tras confirmar la distribución normal de variables. Cuando fue pertinente, se llevaron a cabo comparaciones múltiples *post hoc* entre grupos experimentales usando el test HSD de Tukey. Se utilizó un t-test de muestra independiente al comparar géneros. La información cuantitativa obtenida de los test en adultos que no seguían una distribución normal (por ejemplo la obtenida mediante el protocolo rotarod de velocidades fijas y el

tiempo en el alambre colgante y la barra vertical) se analizaron mediante el test de Kruskal-Wallis.

En todos los casos, se determinó como significación estadística $P \leq 0,05$. El análisis estadístico se llevó a cabo usando SPSS 15.0.

Resultados

La manipulación de los animales para los procedimientos experimentales se llevó a cabo siempre de la misma forma y por parte del mismo investigador para todos los grupos experimentales, con el objetivo de minimizar las diferencias en los resultados debido a la manipulación.

Métodos permanentes de identificación de recién nacidos

Los métodos de identificación se practicaron lo más rápido posible para evitar la manipulación prolongada de los recién nacidos: el método más rápido fue la amputación de falanges (1-1,5 minutos), seguido del tatuaje de las falanges (1-2 minutos), siendo la implantación del transmisor el método más laborioso (3-4 minutos).

Observaciones generales

No se observó perturbación en el nido, rechazo o canibalismo posteriores a la aplicación de ninguno de los métodos usados con los ratones recién nacidos.

La reacción de los recién nacidos al proceso de identificación, medida de acuerdo a las reacciones de micción y vocalización a la amputación de falanges, tatuaje de las falanges e inyección subcutánea de transmisor o sólo inyección subcutánea se presentan en la Tabla 2. El porcentaje de animales que orinaron/vocalizaron durante la implantación de transmisores (*transmisor*) fue mayor que para otros procesos de identificación.

Tabla 2: reacción de micción y/o vocalización de los ratones recién nacidos a los procedimientos de identificación permanente

Grupo experimental	% de animales que orinaron	% de animales que vocalizaron	% de animales que orinaron y vocalizaron
Amputación de falanges	4,5*	4,5*	0*
Tatuaje de falanges	15,0*	25,0**	0*
Transmisor	93,8*	62,5***	62,5*
Control	5,0*	10,0*	0*

Los resultados se presentan según el porcentaje de animales que mostraron estas reacciones. Se aprecian diferencias significativas entre *Transmisor* y otros grupos: * $P < 0,005$ y ** $P = 0,041$ (analizado mediante test exacto de Fisher)

Amputación de falanges

No hubo problemas de hemostasia después de la amputación de falanges (apenas hubo sangrado). Este método de identificación pudo aplicarse muy rápido y se observó muy poca o ninguna reacción por parte de los recién nacidos durante el procedimiento (Tabla 2). En la edad adulta, no se observó regeneración de falange/uña en animales con el dedo amputado y la identificación resultó fácil para el personal experimentado.

El ADN genómico que se extrajo de las falanges amputadas proporcionó una concentración de $154,8 \pm 30,6$ ng/ μ L (media \pm SEM) (3μ g, aproximadamente, de ADN por dedo).

Tatuaje de falanges

Fue necesario inmovilizar a los animales recién nacidos durante 1-2 minutos para llevar a cabo el procedimiento de punción, incluyendo la limpieza del exceso de tinta de la pata del animal. Al igual que en la amputación de falanges, sólo se observó sangrado mínimo con este procedimiento sin problemas de hemostasia. Uno de los machos marcados con esta técnica mostró un defecto de crecimiento en el dedo marcado con tinta: el dedo se retorció en dirección contraria al animal, pero este animal no mostró ninguna dificultad particular a la hora de moverse o llevar a cabo los test usados en el estudio. La identificación de los animales adultos en su cubeta mediante la observación de un dedo verde resultó muy fácil.

Implantación de transmisor

La inyección subcutánea de un transmisor identificador fue el procedimiento de identificación más largo de todos los aplicados en este estudio y pareció causar más dolor. Cuando empezamos a aplicar este método de identificación, seis de catorce recién nacidos perdieron sus transmisores, y cuando adaptamos la técnica empujando el dispositivo hacia atrás y hacia un lado, sólo se perdió uno de los nuevos catorce transmisores inyectados. Además, de un total de 28 transmisores inyectados, cuatro fueron rechazados mediante un proceso inflamatorio en los 2-3 primeros días después de la inyección, y en un caso el transmisor dejó de ser legible en el día después de

haberse inyectado. Los animales implantados con éxito se utilizaron para los subsiguientes test. La identificación individual de compañeros de cubeta con la ayuda del lector (NONATEC V1, puerto USB), fue muy fácil de llevar a cabo.

Efecto de los métodos de identificación en el desarrollo de los recién nacidos**Parámetros somáticos y reflejos neurológicos**

En el nido, hasta el día 5 postnatal, todos los animales presentaban color normal de piel (rosa en la piel ventral y de rosa a gris claro en la piel dorsal), presentaban leche en el estómago (puntos de leche) y movimiento normal, por lo que todos los animales usados en el estudio estaban en buenas condiciones cuando se llevaron a cabo los procedimientos de identificación.

El peso antes del destete estuvo significativamente influenciado por el día del análisis ($P < 0,005$), como era de esperar, pero no se detectaron diferencias significativas al comparar el peso de machos y hembras. El peso de los transmisores (0,24% del peso de los recién nacidos en el día 5 postnatal) se restó al peso total de los animales en el grupo *Transmisor*. Se pudo observar un peso levemente más bajo (no significativo) en los recién nacidos con transmisores entre los días 11 y 19 postnatales al compararlos con los animales de *Amputación de falanges*, *Tatuaje de falanges* y *Control* (Figura 1).

La distancia anogenital suele ser diferente entre machos y hembras. Los machos con transmisores presentaban una distancia anogenital significativamente menor al compararlos con los animales de *Control*, *Amputación de falanges* y *Tatuaje de falanges* ($P < 0,005$, $P = 0,022$ y $P = 0,018$, respectivamente), de acuerdo con lo observado respecto al peso antes del destete. Dado que el peso puede influenciar la distancia anogenital, se calculó el ratio entre distancia anogenital y peso del animal antes del destete; no se pudieron detectar diferencias significativas entre diferentes grupos experimentales, lo que indica que las diferencias detectadas en la distancia anogenital estaban relacionadas con el peso y no eran causadas por el procedimiento de identificación (cifras no mostradas).

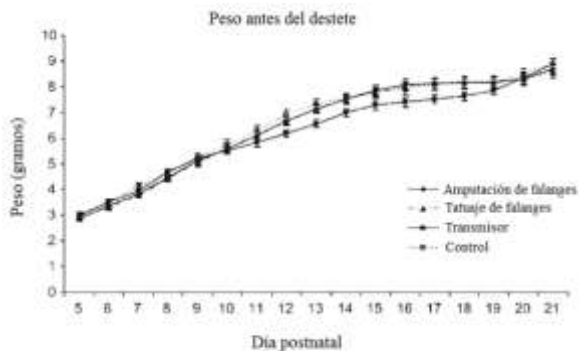


Figura 1: Peso antes del destete entre los días postnatales 5 y 21. El aumento de peso (en gramos) para ambos géneros está agrupado según el grupo experimental. Los valores son media \pm SEM

En los parámetros examinados para evaluar la madurez física de los ratones recién nacidos, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales para los que se usó un método de identificación y el grupo de control.

Sólo se verificó un efecto del género para la “*geotaxis negativa*”, usando el test de Mann-Whitney ($P=0,035$). Aunque no se detectó un efecto del género en los otros parámetros del desarrollo evaluados, se decidió mantener separado el análisis por géneros para todos los parámetros. No se observaron diferencias significativas en la aparición de pelaje, que se produjo entre los días 7 a 8 postnatales (los primeros pelos se detectaron en el día 7, pero se puntuó el pelaje como presente en el día 8) en todos los animales. Se pudo observar claramente un punto de leche en el abdomen de todos los animales hasta el día 7 postnatal, a partir del cual fue más difícil de identificar (cifras no mostradas). La apertura de orejas y ojos se observó entre los días 12 y 14 postnatales y la erupción de incisivos se observó entre los días 8 y 9 postnatales, sin diferencias significativas entre recién nacidos de grupos identificados y de control. No se detectaron diferencias significativas entre animales identificados y no identificados para la adquisición del *reflejo postural* (respuesta madura observada entre los días 9 y 12 postnatales), presentando la mayoría de los animales el reflejo en los días 10 u 11 postnatales, ni para el *reflejo de sujeción* (la capacidad para sujetar un alambre fino estuvo presente en los días 8 a 9 postnatales) (Figuras 2a y b). Se observó la adquisición del reflejo de “*geotaxis negativa*” entre los días 5 y 11 postnatales sin diferencias entre los grupos *Amputación de falanges*, *Tatuaje de falanges*, *Transmisor* y *Control*, lo que demuestra que el procedimiento de identificación no interfirió con la capacidad de los recién nacidos de retornar a su

posición normal y trepar una rejilla inclinada 45° (cifras no mostradas).

Se pudo observar una forma de caminar madura en animales recién nacidos entre los días 12 y 15 postnatales. Se observó un leve (pero no significativo) retraso en el desarrollo del caminar maduro para los animales del grupo *Transmisor* en comparación con los de *Control*, pero este leve retraso resultaba significativo al compararlo con los animales de *Amputación de falanges* y *Tatuaje de falanges*, tanto en hembras ($P<0,005$ y $P=0,006$ respectivamente, Bonferroni $\alpha=0,01$) como en machos ($P\leq 0,005$, Bonferroni $\alpha=0,01$) (Figuras 2a y b). En el periodo evaluado, el *reflejo de enderezamiento en superficie* ya estaba presente en el día postnatal 5 en algunos animales, pero en el día 9 todos los animales habían adquirido el reflejo maduro. Se detectó una diferencia estadísticamente significativa al comparar el día postnatal mediano en el que las hembras de *Transmisor* y *Control* presentaban este reflejo maduro ($P=0,016$, Bonferroni $\alpha=0,017$), pero no se detectaron diferencias significativas entre grupos en el caso de los machos (Figuras 2a y b). Al analizar el tiempo requerido para llevar a cabo el *reflejo de enderezamiento en superficie*, se encontraron diferencias significativas entre días postnatales, reduciéndose el tiempo con el avance de la edad ($P<0,005$) como era de esperar, pero no se detectaron diferencias significativas entre grupos en repetidas mediciones de análisis de varianza (cifras no mostradas). Todos los animales eran capaces de girar y sostenerse sobre las cuatro patas en alrededor de un segundo desde el día 12 postnatal.

El *reflejo de enderezamiento* en el aire se adquirió entre los días 17 y 19 postnatales en todos los animales. La única diferencia significativa que se encontró fue entre los machos de *Tatuaje de falanges* y *Control*, ($P=0,01$, Bonferroni $\alpha=0,017$), revelando un leve retraso para los recién nacidos de *Tatuaje de falanges* (Figuras 2a y b).

La capacidad de *suspensión de alambre* apareció entre los días 12 y 16 postnatales, pero la mayoría de los animales adquirieron la capacidad de sostener su propio peso entre los días 14 y 15 de edad, y no se pudieron detectar diferencias significativas entre animales individualmente identificados y de *Control* (Figuras 2a y b). Tan pronto como se adquirió el reflejo, dejaron de encontrarse diferencias significativas en el tiempo que tardaban en caer del alambre (cifras no mostradas)

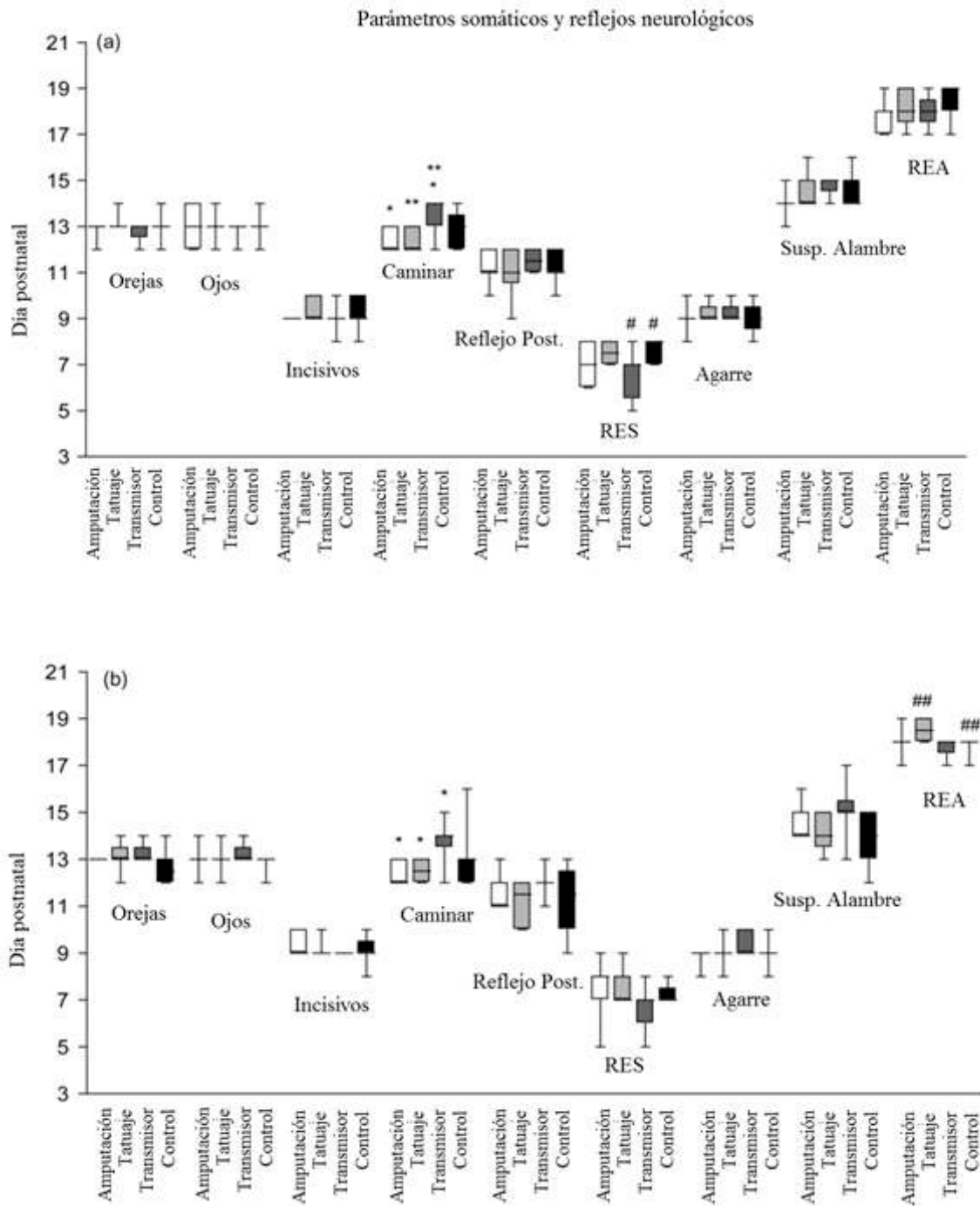


Figura 2: Efectos de los métodos de identificación permanentes en el desarrollo somático y adquisición de reflejos neurológicos de los recién nacidos. Se muestra el día postnatal mediano en el que animales hembra (a) y macho (b) presentaron una respuesta madura (puntuada como presente = 1) para: apertura de orejas (Orejas), apertura de ojos (Ojos), erupción de incisivos (Incisivos), forma de caminar madura (Caminar), reflejo postural (Reflejo Post.), reflejo de enderezamiento en superficie (RES), agarre (Agarre), suspensión de alambre (Susp. Alambre) y reflejo de enderezamiento en el aire (REA). * $P \leq 0,005$ (a) y ** $P \leq 0,017$ (b) (analizado mediante test de Kruskal-Wallis y test de Mann-Whitney con corrección de Bonferroni).

Efectos de los procesos de identificación en el comportamiento adulto y las habilidades motrices

Peso después del destete

Las Figuras 3a y b presentan el peso de ratones C57BL/6J individualmente identificados y de control entre las semanas 4 y 15 después del destete.

No se observaron diferencias en el aumento de peso de animales jóvenes/adultos después del uso de métodos de identificación, tales como la amputación de falanges, tatuaje de falanges o implantación de transmisor, a los 5 días de edad. En la semana 15 los machos y hembras alcanzaron un peso de $22,9 \pm 0,2$ g y $29,2 \pm 0,3$ g (media \pm SEM), respectivamente

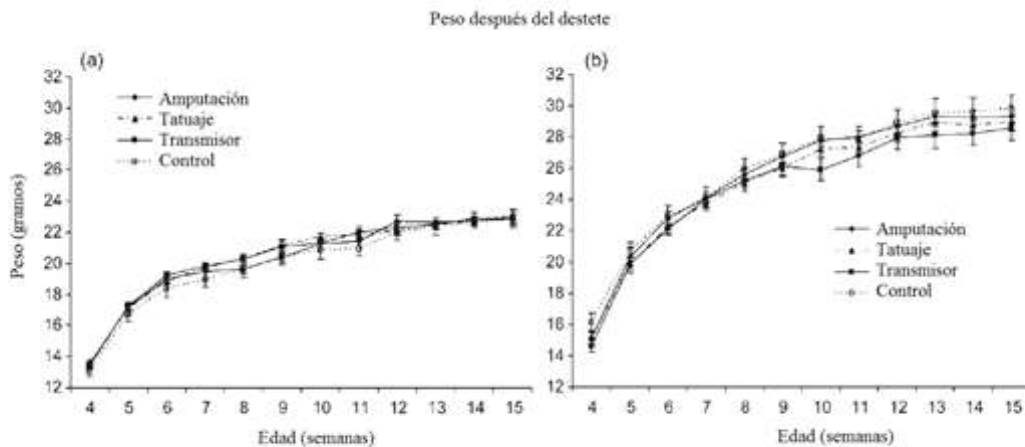


Figura 3 Aumento del peso (en gramos) después del destete (a las 4 semanas de edad) hasta las 15 semanas, en ratones hembra (a) y macho (b). Los valores son media \pm SEM

Comportamiento en la cubeta – trepado

Al analizar el comportamiento de trepado, se encontraron diferencias significativas entre machos y hembras, pero no se detectaron efectos debidos al método de identificación (Figuras 4a y b). La

frecuencia de trepado en hembras fue de $13,1 \pm 1,1$, y los machos presentaron una menor frecuencia de trepado de $4,9 \pm 0,6$ (media \pm SEM; $P < 0,005$). La duración del trepado también fue mayor en hembras comparado con machos: $153,3 \pm 13,0$ y $53,0 \pm 8,3$ segundos, respectivamente (media \pm SEM; $P < 0,005$).

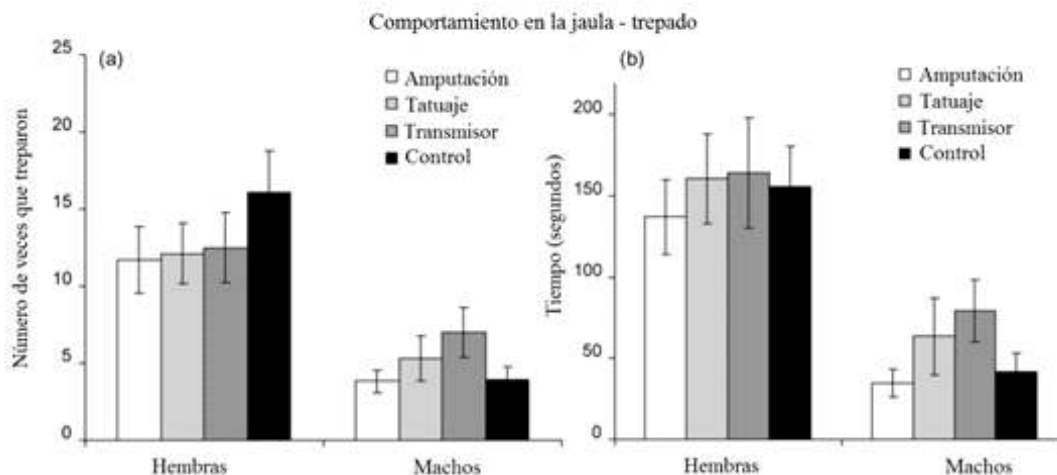


Figura 4 Análisis del comportamiento en jaula: se presentan la frecuencia de trepado (a) y duración (b) para cada grupo experimental en hembras (izquierda) y machos (derecha). Los valores son media \pm SEM

Laberinto en cruz elevado

No se encontraron diferencias significativas entre grupos y género en el test del laberinto en cruz elevado. El porcentaje de tiempo promedio que los animales permanecieron en los brazos abiertos fue $14,4 \pm 0,8$ segundos (media \pm SEM), mientras que el número de entradas a los brazos cerrados reveló una media de $12,5 \pm 0,5$ entradas (media \pm SEM).

Examen primario simplificado SHIRPA

Como se ha mostrado anteriormente, el peso después del destete no mostró diferencias entre grupos y no se

esperaba que influenciase posibles diferencias en el examen primario simplificado SHIRPA utilizado en este estudio. No se encontraron diferencias entre grupos para *agitación por traslado* o *comportamiento al caminar* en la plataforma, donde todos los animales presentaron un comportamiento normal. Lo mismo sucedió en el caso de la posición *visual*, *fuerza de agarre* y reacción al *pellizco de dedos*, así como para los test de *manipulación de alambre* y *barra vertical* (los animales fueron capaces de mantenerse sujetos a la barra y desplazarse moderadamente hacia arriba/abajo, y el tiempo medio que tardaron en caer de

la barra fue de $106,7 \pm 4,8$ segundos en hembras y $94,7 \pm 6,3$ segundos en machos; los valores son media \pm SEM).

No se detectaron diferencias entre grupos en el test del *alambre colgante*, *reflejo de enderezamiento*, comportamiento de “*geotaxis negativa*” y tiempo de girar y moverse hacia arriba, o en la reacción de los animales a estar sujetos, micción o defecación durante el protocolo de examen primario simplificado SHIRPA (cifras no mostradas).

Para la actividad locomotriz en la plataforma, medida por el número de cuadrados a través de los que caminó el animal durante un periodo de 30 segundos, un test HSD de Tukey mostró una diferencia significativa entre machos del grupo *Amputación de falanges* y *Transmisor* cuando se los comparaba con machos del grupo *Tatuaje de falanges* ($P=0,036$ y $P=0,012$, respectivamente), que presentaban un mayor rendimiento, pero no se encontraron diferencias significativas al comparar a los animales identificados con los de control (Figura 5). No se encontraron diferencias entre el número de cuadrados atravesados por diferentes grupos de hembras, aunque fueron más activas que los machos en este test ($P=0,018$). El test de la *huella* reveló un paso normal sin diferencias entre grupos, revelando que la longitud del paso, ancho entre las pisadas de las patas delanteras y traseras y uniformidad de la alternancia de pasos no se veían afectados en ratones con un dedo amputado, tatuado o que llevasen un transmisor desde el día postnatal 5 (cifras no mostradas)..

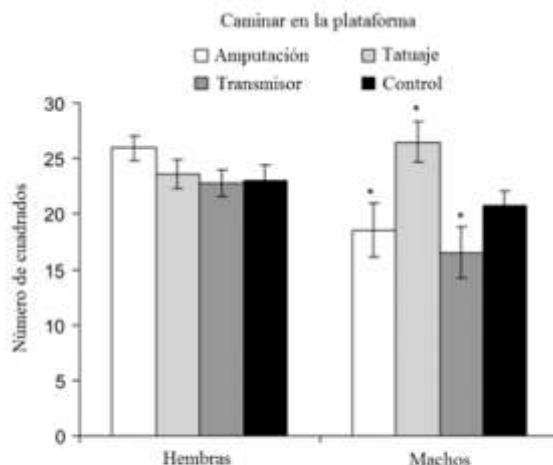


Figura 5 Actividad locomotriz de ratones C57BL/6J medida sobre una plataforma (en el número de cuadrados atravesados) durante un protocolo de examen primario simplificado SHIRPA. Los valores son media \pm SEM. * $P \leq 0,05$ (analizado mediante test de Tukey HSD)

Rotarod

El análisis del rendimiento en el test rotarod, usando una serie de seis velocidades constantes, no mostró ninguna diferencia entre machos y hembras. Las hembras del grupo *Amputación de falanges* presentaban un tiempo más corto en caer de la barra a una velocidad constante de 15 rpm (Figura 6); no se encontraron diferencias significativas al comparar animales identificados individualmente de forma permanente con animales de control, pero múltiples comparaciones que emplearon un test de Mann-Whitney con corrección de Bonferroni mostraron una diferencia significativa entre los grupos de *Tatuaje de falanges* y de *Amputación de falanges* (Bonferroni

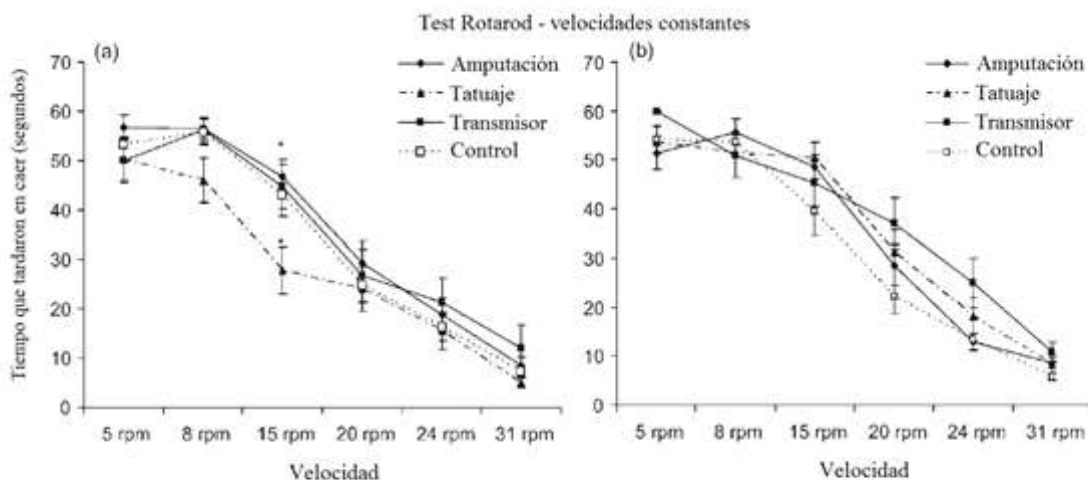


Figura 6 Test Rotarod: tiempo que tardaron en caer de la barra (en segundos) a diferentes velocidades constantes: 5, 8, 15, 20, 24 y 31 rpm (a: hembras, b: machos). Cada línea representa un grupo de animales, bien identificados en el día postnatal 5 o de control. Los valores son media \pm SEM. * $P \leq 0,005$ (analizado mediante múltiples comparaciones con corrección de Bonferroni)

$\alpha=0,01$; $P<0,005$). No se detectaron diferencias a ninguna otra velocidad. Cuando se aplicó el protocolo de aceleración, no se encontraron diferencias entre grupos o entre géneros tanto para el tiempo que tardaban en caer de la barra aceleradora y la velocidad a la que los animales caían de la barra (cifras nomostradas). Aunque no se encontraron diferencias significativas entre grupos, se apreció una mejora en el tiempo que tardaban en caer y en la velocidad a la que los animales caían de la barra, lo que demuestra una capacidad de aprendizaje motriz ($P<0,005$).

Discusión

Métodos de identificación para el marcado de ratones recién nacidos

En el presente estudio se evaluó de forma sistemática el impacto de tres métodos de identificación de ratones recién nacidos con el objetivo de identificar posibles efectos negativos sobre el desarrollo, comportamiento y bienestar de los animales. La amputación de falanges se ha usado en muchas instalaciones para animales como un método fiable para la identificación permanente de roedores muy jóvenes y ha demostrado ser un método de marcado eficaz en nuestro estudio. Fue el método más fácil y rápido comparado con los otros dos procedimientos de identificación y, sorprendentemente, los recién nacidos mostraron una reacción muy leve a la rápida amputación de un dedo.

En general, se evidenció que cuanto más se prolongó el procedimiento de identificación, los animales mostraron más signos de dolor y malestar²⁸. La inyección subcutánea de los transmisores causó sufrimiento adicional ya que el procedimiento debía incluir un paso en el que se masajeaba el transmisor lateralmente y hacia atrás para evitar que los transmisores se perdiesen, lo que obviamente causó dolor a los recién nacidos. La aplicación del tatuaje en las falanges fue relativamente fácil, aunque requirió más precisión y habilidad que la amputación de falanges, y un mayor tiempo de sujeción, lo que se reflejó en un porcentaje levemente más alto de animales que orinaron y vocalizaron durante este método de marcado. En un caso, el procedimiento de punción de tinta afectó al crecimiento normal del dedo, pero el comportamiento de este animal no fue diferente del de otros animales usados en el presente estudio. Tras marcar con éxito a los animales, todos los métodos de identificación empleados se mostraron igualmente fiables y eficientes a lo largo del estudio.

La amputación de falanges, aunque no se recomienda por razones éticas y humanitarias,⁹ sigue siendo un método de identificación individual fiable, y es el único de los tres métodos aquí empleados que proporciona tejido para genotipado. Generalmente se realizan biopsias de cola con este propósito, lo que también interfiere con la integridad física del animal. Nuestros resultados demuestran que la cantidad de ADN recuperada de los dedos amputados es suficiente para llevar a cabo varias reacciones en cadena de polimerasa (PCR), pero no para el análisis de Southern blot.³⁷ Este resultado se corresponde con estudios previos que usaron lisados de dedos de ratón para el genotipado de grandes colonias de ratones, en los que los lisados de ADN de dedos demostraron dar resultados de PCR fiables incluso después de haber sido conservados a -20°C durante más de un año, permitiendo que los ensayos se confirmaran más adelante en caso necesario.¹⁷

La identificación mediante transmisor tiene la ventaja de estar asociada con el registro de información en un sistema de seguimiento computerizado. Los transmisores usados en el presente estudio se recuperaron del cuerpo de los animales tras la eutanasia y demostraron estar en buenas condiciones para usarse de nuevo tras haber sido esterilizados a altas temperaturas, lo que puede reducir los costes asociados a este método de identificación. Debería tenerse en cuenta al usar este método de identificación la posibilidad de que se produzca un rechazo de los transmisores en los primeros 2-3 días posteriores a su inyección en crías recién nacidas, o de que los transmisores pierdan su capacidad de transmitir por radiofrecuencia. Una ventaja del uso de transmisores es que pueden conservarse dentro de tejidos que se hayan extirpado al animal para conservar información de seguimiento del animal original. Al contrario que en algunos estudios a largo plazo,^{20, 25, 26} no se detectaron tumores asociados a los transmisores en ratones C57BL/6J de 20 semanas de edad en el presente estudio.

Desarrollo postnatal después del marcado individual

Para evaluar el bienestar de los recién nacidos y las posibles consecuencias negativas de los métodos de identificación individual en su desarrollo o comportamiento, usamos un enfoque sistemático basado en protocolos estándar de seguimiento del comportamiento. Observamos un desarrollo y

basado en protocolos estándar de seguimiento del comportamiento. Observamos un desarrollo y comportamiento normales en todos los ratones empleados desde el día de su nacimiento hasta el día del procedimiento de identificación (días 0 a 4 postnatales), lo que sugiere que su bienestar no se vio perjudicado. Cuando identificamos individualmente a las crías en el día 5 postnatal, no se observó perturbación del nido, canibalismo o rechazo por parte de la madre, lo que coincide con informes anteriores sobre ratones tatuados.^{5,7}

Los protocolos estandarizados para test neurocomportacionales para el análisis/clasificación del crecimiento físico y la madurez de reflejos neurológicos, han sido ampliamente usados para el fenotipado de varias cepas de ratón y para evaluar el bienestar de roedores de laboratorio antes y después del destete.^{30,31,33,38-44} Al comparar el crecimiento en los grupos de *Amputación de falanges*, *Tatuaje de falanges* y *Transmisor* con animales de *Control*, no se encontró un impacto negativo en el crecimiento de los recién nacidos para ninguno de los métodos de identificación. En el momento del destete, las medias del peso de los animales eran muy similares para todos los grupos de animales y presentaban valores normales.⁸ Los parámetros que indicaban el bienestar de crías de ratón, tales como el crecimiento físico, alimentación, apariencia del pelaje y presencia de un punto de leche, no se vieron afectados por los métodos de identificación, indicando que el sufrimiento agudo causado por los procedimientos no interfería con el bienestar y desarrollo de los animales en los subsiguientes días postnatales. La madurez física evaluada de acuerdo con el momento de apertura de ojos y orejas y la erupción de incisivos también fue normal en animales individualmente identificados, y similar a la de los animales de control.

Una versión modificada de la batería de test desarrollados por Fox³³ y Altman y Sudarshan³⁸ se ha usado en varios estudios con roedores neonatos^{31,33,38,41,45} para evaluar la madurez general del sistema nervioso, bienestar y efectos del estrés. En nuestro estudio, no se detectaron diferencias significativas entre animales individualmente identificados y de control, en la adquisición de *reflejo postural* y *“geotaxis negativa”*. En el caso del *reflejo de enderezamiento en superficie*, se detectó una diferencia estadísticamente significativa solamente cuando se compararon los días postnatales medianos en los que las hembras de los grupos de *Transmisor* y

Control presentaban un reflejo maduro, pero esto no se verificó en los machos. Estos test requieren que la integridad de las funciones musculares y motrices dependa de la adquisición de coordinación simétrica entre los lados izquierdo y derecho del cuerpo.⁴⁶ La *“geotaxis negativa”* se ha usado como test para una respuesta de orientación no aprendida en oposición a estímulos gravitacionales, con el objetivo de evaluar la función vestibular (tales como los reflejos postural y de enderezamiento^{38, 47}), pero recientemente se ha argumentado que es más útil para evaluar la estabilidad postural en un plano inclinado.⁴⁸ El *reflejo de sujeción* fue adquirido por animales identificados individualmente en el mismo periodo postnatal que los ratones de *Control*, demostrando que no es posible atribuir un efecto negativo en la capacidad de agarre a la amputación de falanges, como se ha sugerido previamente.^{2,9}

Una forma de caminar madura, la suspensión de alambre y el reflejo de enderezamiento en el aire, que aparecen más tarde en el periodo postnatal, requieren competencias locomotrices más complejas.^{33, 38} Los ratones C57BL/6 identificados individualmente por lo general mostraban una buena coordinación muscular y buen desarrollo de fuerza muscular en estos test de comportamiento, comparables a los animales de *Control*; la única excepción fue que los machos de *Tatuaje de falanges* presentaban un leve retraso en el desarrollo del reflejo de enderezamiento en el aire, pero este retraso no pudo confirmarse en hembras. Se detectó un retraso en la aparición de la forma de caminar madura en los animales del grupo *Transmisor* en comparación con los otros grupos de animales identificados individualmente, pero el retraso no era estadísticamente significativo al compararlo con los animales de *Control*. El test de suspensión de alambre, que evaluaba el control del equilibrio y la fuerza muscular tampoco mostró diferencias entre grupos. Todos los parámetros evaluados desde el día 5 postnatal hasta el destete se desarrollaron temporalmente igual que en otros estudios.^{31, 33, 38, 41} El presente estudio no mostró diferencias consistentes en la mayoría de los parámetros de desarrollo somático y de desarrollo de los reflejos neurológicos durante el periodo postnatal como resultado de los procedimientos de identificación individual de los recién nacidos. El desarrollo de la función neuromuscular fue, por lo general, similar para los ratones C57BL/6 de los grupos *Amputación de falanges*, *Tatuaje de falanges* o *Transmisor* cuando se los comparó con animales de *Control*; y las

habilidades motrices, coordinación y equilibrio no se vieron afectadas por la ausencia de la falange distal de un dedo o por llevar un transmisor. El pequeño, pero estadísticamente significativo, retraso en el desarrollo de la forma de caminar madura que se detectó para los animales del grupo *Transmisor* en comparación con los de *Amputación de falanges* y *Tatuaje de falanges*, en ambos géneros, puede deberse a la implantación dorso-lateral de un transmisor.

Evaluación del comportamiento y bienestar adultos: impacto de la identificación individual

Registrar en vídeo el comportamiento del animal es un método para evaluar el bienestar del animal a través de observación no invasiva en su cubeta. El comportamiento en la cubeta se ha usado, por ejemplo, para detectar cambios en el comportamiento (locomoción, acicalado, comportamiento social, trepado, etc.), como un indicador de bienestar y para evaluar las consecuencias de procedimientos de cría y tamaños de los grupos y las cubetas en ratones de laboratorio.⁴⁹⁻⁵¹ Usamos este método para evaluar posibles diferencias al trepar, un comportamiento normal de los ratones, que puede verse afectado por la presencia de dolor.⁵² A las 10 semanas de edad, la frecuencia y duración del trepado de animales identificados individualmente era comparable a la de los de control, siendo las hembras más activas que los machos, tal y como muestran otros estudios que usan ratones C57BL/6.⁴⁹ Podría esperarse que la amputación de falanges, por ejemplo, tuviera una influencia sobre la capacidad para trepar,⁹ pero nuestro estudio demostraba claramente que este comportamiento no se veía afectado por este procedimiento de identificación. Este resultado es digno de notarse ya que esta preocupación se ha mencionado como una de las desventajas de este método de identificación.

El protocolo SHIRPA, un protocolo semi-cuantitativo en tres fases desarrollado por Rogers *et al.*³⁷ en 1997, y que incluye una batería de test neurocomportacionales, se ha usado ampliamente, tanto en su versión original como en nuevas versiones modificadas, para la evaluación del comportamiento en programas de mutagénesis ENU con el objetivo de analizar en busca de fenotipos dominantes y disfunción neurológica en ratones, así como caracterizar diferencias en el comportamiento de diferentes cepas (véase referencias 36, 53-55). En el presente estudio, las funciones musculares, de

neuronas motoras inferiores y del tracto espinocerebeloso no se vieron afectadas en animales amputados, tatuados o con transmisor implantado. En lo que se refiere a actividad locomotriz de hecho las hembras mostraron un rendimiento mayor a los machos, y los machos del grupo *Tatuaje de falanges* se movieron más que los machos de otros grupos de machos identificados, pero no se detectaron diferencias al compararlos con los animales de control. La función neuromuscular de animales adultos identificados individualmente demostró ser normal, y no se pudo detectar ninguna deficiencia en la capacidad para sujetar un alambre/barra y sostener su peso en el test de *alambre colgante* independientemente del hecho de que al animal le faltara parte de un dedo o llevase un transmisor. Tampoco se vieron afectadas ni la capacidad del animal para agarrarse y desplazarse sin caerse en el test de la *barra vertical* ni la función sensomotriz. Incluso cuando el dedo pellizcado era uno de los dedos amputados, el reflejo de flexión ipsilateral era el mismo, indicando que la función sensomotriz no había sido afectada. En el test de "*geotaxis negativa*" la mayoría de los animales giraron y treparon la rejilla sin dar muestras de inestabilidad postural mediante la aplicación de fuerzas rotatorias mientras sujetaban la rejilla de cubeta. Se obtuvieron respuestas similares al comparar grupos de animales identificados individualmente y de control. No se detectaron signos de disfunción neuropsiquiátrica en ninguno de los animales durante este estudio, pero se manifestaron vocalización e irritabilidad hasta cierto punto, lo que es una respuesta normal a la manipulación.⁵⁴ La vocalización, micción y defecación al ser manipulados fueron similares en todos los animales que mostraban una función autonómica normal, y una respuesta afectivo-motriz normal en una situación de restricción. Nuestros resultados fueron comparables a los de estudios previos que usaron protocolos de examen primarios SHIRPA para el fenotipado de ratones endogámicos C57BL/6J.^{36,54}

Medir la huella de los pasos evalúa los patrones al caminar y se ha usado para estudiar los movimientos y coordinación motriz en roedores, proporcionando información sobre la función cerebelosa.^{40,56,57} En este estudio los ratones no presentaron anomalías en los patrones al caminar como consecuencia del procedimiento de marcado al compararlos con animales de control.

El test rotarod, que mide la función locomotriz y la coordinación,^{35,40,44,56,57} confirmó que no había grandes

diferencias en las capacidades locomotrices de animales identificados individualmente excepto en un test de velocidad constante en particular, a 15 rpm, en el que las hembras del grupo *Tatuaje de falanges* presentaban un tiempo de latencia menor antes de caer de la barra en movimiento, lo que no se detectó en machos. Además, al usar una barra en aceleración (0,6 rpm/s), no pudieron detectarse diferencias entre los diferentes grupos. Los resultados generales obtenidos en el rotarod no nos permitieron concluir que una disfunción real de la coordinación motriz y del equilibrio en las hembras *Tatuaje de falanges* a una velocidad constante de 15 rpm pudiera deberse al hecho de que esas hembras tenían un dedo marcado con tinta. La capacidad de aprendizaje motriz, un parámetro de medida del aprendizaje cerebeloso, también se verificó a través del rendimiento mejorado mostrado en el rotarod en pruebas sucesivas, sin que hubiese una influencia de la identificación individual. El laberinto en cruz elevado es un test estándar que se usa para evaluar comportamiento que indica ansiedad y para probar fármacos ansiolíticos en roedores.^{45, 58-60} También se usa para el fenotipado de roedores por su comportamiento^{35, 40, 44} tomando como indicador de ansiedad el equilibrio entre la exploración de lo novedoso y el evitar espacios abiertos muy iluminados, lo que también proporciona información sobre la actividad locomotriz. En el presente estudio, no se encontraron diferencias entre grupos en lo que se refiere al rendimiento en el laberinto en cruz elevado. Además, nuestros resultados concuerdan con publicaciones anteriores que comparan el rendimiento de diferentes cepas de ratones en el test del laberinto en cruz elevado.^{59, 61}

La evaluación del comportamiento es complicada, y las mediciones del mismo, normalmente se usan conjuntamente con información fisiológica.⁶² Aunque en este estudio no se detectaron signos de sufrimiento en el comportamiento, se llevó a cabo una evaluación adicional y retrospectiva del bienestar de los animales al final del estudio basada en el peso de las glándulas suprarrenales y el timo. Se sabe que el peso del timo disminuye bajo la influencia del estrés, como consecuencia del aumento en la apoptosis de células del timo^{63, 64} y el peso suprarrenal refleja la actividad del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HHA) en respuesta al estrés, que aumenta en animales que sufren de estrés crónico. El peso de los órganos *post mortem* confirmó los resultados de la observación del

comportamiento indicando que la identificación individual de animales por medio de amputación de falanges, tatuaje por punción de un dedo o implantación subcutánea de un transmisor no habían causado efectos o sufrimiento a largo plazo.

En conclusión, se puede afirmar que los métodos para la identificación de ratones recién nacidos estudiados probaron ser efectivos para el marcado individual a largo plazo de ratones C57BL/6. La implantación de un transmisor, aunque fuera de pequeño tamaño, demostró ser más difícil de practicar y causa de mayor sufrimiento para las crías. La amputación de falanges, un método que normalmente no se recomienda por motivos éticos y de bienestar, demostró no obstante ser el que producía una menor respuesta relacionada al dolor/sufrimiento en crías recién nacidas en el día 5 postnatal. El uso de este método de identificación podría incluso ser recomendable para el estudio de animales genéticamente modificados en los que normalmente se toman muestras de tejido para la extracción de ADN para el genotipado de los animales. En este caso, recomendaríamos el uso de este método a una edad temprana (entre los días 3 y 7 postnatales), antes de que la osificación se haya completado, pero permitiendo ya obtener suficiente tejido para realizar el genotipado. El tatuaje por punción con tinta verde en un dedo, también demostró ser viable en ratones recién nacidos, y especialmente fácil de distinguir en ratones C57BL/6 jóvenes/adultos por el contraste entre la tinta verde y la piel y pelaje negros. La aplicación del tatuaje por punción causó un sufrimiento levemente mayor que la amputación de falanges, pero en casos en los que no se necesite tejido, este método podría ser preferible y éticamente justificable al no interferir con la integridad del animal.

Los presentes resultados mostraron que no había diferencias generales consistentes para la mayoría de parámetros de desarrollo de reflejos somáticos y neurológicos durante el periodo postnatal como consecuencia de los procedimientos de identificación individual empleados, con la excepción de un leve retraso en el desarrollo de la forma de caminar madura detectado en los animales del grupo *Transmisor*. Este resultado, junto con los signos de dolor/sufrimiento durante el procedimiento de inyección subcutánea y masaje necesarios para implantar con éxito los transmisores, sugiere que este método de identificación individual no debería aplicarse a recién nacidos C57BL/6 de cinco días de edad. La

identificación por transmisor tiene la ventaja de permitir el registro de información mediante sistemas computarizados de seguimiento, lo que es útil para la gestión de colonias de gran tamaño y para la creación de bases de datos que contengan datos de investigación de animales individuales bien organizadas y de fácil acceso, pero el uso de este método debería considerarse sólo para crías de mayor edad.

No se detectó malestar o falta de bienestar en animales adultos. En general, nuestros resultados indicaron que las funciones neuromuscular, del tracto espinocerebeloso y sensorial, incluyendo la reacción al pellizco de dedos, patrones al caminar, coordinación motriz, equilibrio y comportamiento trepador no se ven perjudicadas como consecuencia de la ausencia de la parte distal de un dedo, el marcado con tinta de un dedo o un transmisor implantado en la parte dorsal. No detectamos ninguna alteración en el comportamiento que indica ansiedad en adultos, y no se pudo relacionar ningún impacto negativo obvio ni perturbación del bienestar con ninguno de los tres métodos de identificación estudiados.

Para finalizar, en cualquier experimento que requiera la identificación a largo plazo de ratones de corta edad, deberían considerarse las ventajas y desventajas de cada método con el objetivo de elegir el más adecuado y que cause menor sufrimiento a la edad que corresponda. Además, debería proporcionarse la formación apropiada a las personas que lleven a cabo las técnicas para minimizar el dolor y/o sufrimiento de los animales que sean inevitables durante el proceso de identificación.

Agradecimientos

Agradecemos a Lutronic International (Rodange, Luxemburgo) que nos haya proporcionado los transmisores para identificación, así como su correspondiente lector/escritor y software. También agradecemos al Profesor Pedro Oliveira sus útiles comentarios sobre las estadísticas. Debido a que este estudio estuvo enmarcado en la tesis de máster del autor principal, también queremos agradecer a Laboratory Animals Ltd su apoyo económico.

Referencias

- 1 Donovan J, Brown P. Animal identification. *Curr Protoc Immunol* 2006, Chapter 1: Unit 1.5, Supplement 73 of the book/CDROM
- 2 Wang L. A primer on rodent identification methods. *Lab*

- Anim (NY)* 2005;**34**:64–7
- 3 Dubin S. A method for numbering laboratory animals using the binary number system. *Lab Anim Care* 1968;**18**:574–6
- 4 Kumar RK. Toe-clipping procedure for individual identification of rodents. *Lab Anim Sci* 1979;**29**:679–80
- 5 Avery DL, Spyker JM. Foot tattoo of neonatal mice. *Lab Anim Sci* 1977;**27**:110–12
- 6 Greenham LW. Tattooing newborn albino mice in life-span experiments. *Lab Anim Sci* 1978;**28**:346
- 7 Schoenborne BM, Schrader RE, Canolty NL. Tattooing newborn mice and rats for identification. *Lab Anim Sci* 1977;**27**:110
- 8 Baumans V. The laboratory mouse: identification and sexing. In: Poole T, ed. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals: Terrestrial Vertebrates*. 7th edn. Oxford: Blackwell Science Ltd, 1999:291
- 9 Robinson V, Morton DB, Anderson D, *et al.* Refinement and reduction in production of genetically modified mice. *Lab Anim* 2003;**37**(Suppl. 1):S1–49
- 10 Institute of Laboratory Animal Research CoLSNRC. *Population Management: Identification and Records. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington, DC: National Academies Press, 1996
- 11 *IACUC Policy: Tail Clipping and Toe Clipping of Mice and Rats*. See <http://researchcompliance.uc.edu/iacuc/PoliciesFolder/policy002.pdf>. University of Cincinnati, 2003
- 12 *IACUC Policies and Standard Operating Procedures: Identification Methods for Rodents*. See http://research.unc.edu/iacuc/sop/rodent_identification.php. The University of North Carolina, Chapel Hill, 2005
- 13 *UCAR Policy on Toe Clipping*. See <http://www.urmc.rochester.edu/ucar/manual/toeclip.htm>. University of Rochester Medical Center, 2005
- 14 *OACU Guidelines for Toe Clipping of Rodents*. See <http://oacu.od.nih.gov/ARAC/FinalToeClip0504.pdf>. National Institutes of Health, 2005
- 15 *Animal Care and Use Program Policy: Tail and Toe Clipping in Mice*. See http://vetmed.duhs.duke.edu/documents/iacuc/pdf/policy_on_tail_and_toe_clipping_of_mice.pdf. Duke University, 2009
- 16 Han M, Yang X, Lee J, Allan CH, Muneoka K. Development and regeneration of the neonatal digit tip in mice. *Dev Biol* 2008;**315**:125–35
- 17 Nadon NL, Draeger K. Genomic DNA analysis from mouse toe lysates. *Transgenic Res* 1996;**5**:209–11
- 18 Weyand EH, Weir T. Abstracts of Scientific

- Presentations 2006 AALAS National Meeting, Salt Lake City, Utah. PS33 – Neonate tattoo identification: an alternative to toe clipping. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2006;**4S**:72–133
- 19 Van Gassen KL, Hessel EV, Ramakers GM, *et al.* Characterization of febrile seizures and febrile seizure susceptibility in mouse inbred strains. *Genes Brain Behav* 2008;**7**:578–86
- 20 Le Calvez S, Perron-Lepage MF, Burnett R. Subcutaneous microchip-associated tumours in B6C3F1 mice: a retrospective study to attempt to determine their histogenesis. *Exp Toxicol Pathol* 2006;**57**:255–65
- 21 Kort WJ, Hekking-Weijma JM, TenKate MT, Sorm V, VanStrik R. A microchip implant system as a method to determine body temperature of terminally ill rats and mice. *Lab Anim* 1998;**32**:260–9
- 22 Baumans V. Science-based assessment of animal welfare: laboratory animals. *Rev Sci Technol* 2005;**24**:503–13
- 23 Sorensen DB, Stub C, Jensen HE, *et al.* The impact of tail tip amputation and ink tattoo on C57BL/6JBomTac mice. *Lab Anim* 2007;**41**:19–29
- 24 Iwaki S, Matsuo A, Kast A. Identification of newborn rats by tattooing. *Lab Anim* 1989;**23**:361–4
- 25 Blanchard KT, Barthel C, French JE, *et al.* Transponder-induced sarcoma in the heterozygous p53^b/2mouse. *Toxicol Pathol* 1999;**27**:519–27
- 26 Tillmann T, Kamino K, Dasenbrock C, *et al.* Subcutaneous soft tissue tumours at the site of implanted microchips in mice. *Exp Toxicol Pathol* 1997;**49**:197–200
- 27 Nicklas W, Baneux P, Boot R, *et al.* Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim* 2002;**36**:20–42
- 28 Mellor DJ, Cook CJ, Stafford KJ. Quantifying some response to pain as a stressor. In: Moberg GP, Mench JA, eds. *The Biology of Animal Stress – Basic Principles and Implications for Animal Welfare*. UK: CAB International, 2000:171–98
- 29 Lloyd M, Wolfensohn S, Thornton P. Quantitative assessment of welfare in experimental animals: the development and use of scoring systems. In: Balls M, Van Zeller A-M, Halder ME, eds. *Progress in the Reduction, Refinement and Replacement of Animal Experimentation*. Amsterdam: Elsevier, 2000:1107–17
- 30 Wells DJ, Playle LC, Enser WE, *et al.* Assessing the welfare of genetically altered mice. *Lab Anim* 2006;**40**:111–14
- 31 Costa P. Neuro-behavioural tests in welfare of transgenic animals. In: *Harmonization of Laboratory Animal Husbandry: Transgenic Animals*. 6th FELASA symposium. Basel: SGV, 1996:51–3
- 32 Santos M, Silva-Fernandes A, Oliveira P, Sousa N, Maciel P. Evidence for abnormal early development in a mouse model of Rett syndrome. *Genes Brain Behav* 2007;**6**:277–86
- 33 Fox WM. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. *Anim Behav* 1965;**13**:234–41
- 34 Ottoni EB. EthoLog 2.2: a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behav Res Methods Instrum Comput* 2000;**32**:446–9
- 35 Rogers DC, Fisher EM, Brown SD, Peters J, Hunter AJ, Martin JE. Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mamm Genome* 1997;**8**:711–13
- 36 Masuya H, Inoue M, Wada Y, *et al.* Implementation of the modified-SHIRPA protocol for screening of dominant phenotypes in a large-scale ENU mutagenesis program. *Mamm Genome* 2005;**16**:829–37
- 37 Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. 3rd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (CSHL), 2001
- 38 Altman J, Sudarshan K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim Behav* 1975;**23**:896–920
- 39 Costa P. Production of transgenic animals: practical problems and welfare aspects. In: Van Zutphen LFM, Van der Meer M, eds. *Welfare aspects of transgenic animals*. In: *Proceeding EC-workshop of 30 October 1995*. Berlin: Springer, 1995:68–77
- 40 Sousa N, Almeida OF, Wotjak CT. A hitchhiker's guide to behavioural analysis in laboratory rodents. *Genes Brain Behav* 2006;**5**(Suppl. 2):5–24
- 41 Van der Meer M, Costa P, Baumans V, Olivier B, Van Zutphen LFM. Welfare assessment of transgenic animals: behavioural responses and morphological development of newborn mice. *Altern Lab Anim (ATLA)* 1999;**27**:857–68
- 42 Van der Meer M, Baumans V, Hofhuis FM, Olivier B, van Zutphen BF. Consequences of gene targeting procedures for behavioural responses and morphological development of newborn mice. *Transgenic Res* 2001;**10**:399–408
- 43 Van der Meer M, Baumans V, Olivier B, van Zutphen BL. Impact of transgenic procedures on behavioral and physiological responses in postweaning mice. *Physiol Behav* 2001;**73**:133–43
- 44 Crawley JN. Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. *Brain Res* 1999;**835**:18–26
- 45 Mesquita AR, Pego JM, Summavielle T, Maciel P,

- Almeida OF, Sousa N. Neurodevelopment milestone abnormalities in rats exposed to stress in early life. *Neuroscience* 2007;**147**:1022–33
- 46 Dierssen M, Fotaki V, Martinez de Legrán M, *et al.* Neurobehavioral development of two mouse lines commonly used in transgenic studies. *Pharmacol Biochem Behav* 2002;**73**:19–25
- 47 Khan Z, Carey J, Park HJ, Lehar M, Lasker D, Jinnah HA. Abnormal motor behavior and vestibular dysfunction in the stargazer mouse mutant. *Neuroscience* 2004;**127**:785–96
- 48 Motz BA, Alberts JR. The validity and utility of geotaxis in young rodents. *Neurotoxicol Teratol* 2005;**27**:529–33
- 49 Van der Meer M, Baumans V, Olivier B, Van Zutphen LFM. Impact of transgenic procedures on behavioral and physiological responses in postweaning mice. *Physiol Behav* 2001;**73**:133–43
- 50 Van Loo PL, Mol JA, Koolhaas JM, Van Zutphen LFM, Baumans V. Modulation of aggression in male mice: influence of group size and cage size. *Physiol Behav* 2001;**72**:675–83
- 51 Van Loo PL, Van der Meer E, Kruitwagen CL, Koolhaas JM, Van Zutphen LFM, Baumans V. Long-term effects of husbandry procedures on stress-related parameters in male mice of two strains. *Lab Anim* 2004;**38**:169–77
- 52 Van Loo PL, Kuin N, Sommer R, Avsaroglu H, Pham T, Baumans V. Impact of 'living apart together' on postoperative recovery of mice compared with social and individual housing. *Lab Anim* 2007;**41**:441–55
- 53 Gkoutos GV, Green EC, Mallon AM, *et al.* Ontologies for the description of mouse phenotypes. *Comp Funct Genomics* 2004;**5**:545–51
- 54 Rogers DC, Jones DN, Nelson PR, *et al.* Use of SHIRPA and discriminant analysis to characterise marked differences in the behavioural phenotype of six inbred mouse strains. *Behav Brain Res* 1999;**105**:207–17
- 55 Rogers DC, Peters J, Martin JE, *et al.* SHIRPA, a protocol for behavioural assessment: validation for longitudinal study of neurological dysfunction in mice. *Neurosci Lett* 2001;**306**:89–92
- 56 Carter RJ, Lione LA, Humby T, *et al.* Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci* 1999;**19**:3248–57
- 57 Brooks SP, Pask T, Jones L, Dunnett SB. Behavioural profiles of inbred mouse strains used as transgenic backgrounds. I: motor tests. *Genes Brain Behav* 2004;**3**:206–15
- 58 Mesquita AR, Correia-Neves M, Roque S, *et al.* IL-10 modulates depressive-like behavior. *J Psychiatr Res* 2008;**43**:89–97
- 59 Trullas R, Skolnick P. Differences in fear motivated behaviors among inbred mouse strains. *Psychopharmacology (Berl)* 1993;**111**:323–31
- 60 Ramos A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? *Trends Pharmacol Sci* 2008;**29**:493–8
- 61 Voikar V, Koks S, Vasar E, Rauvala H. Strain and gender differences in the behavior of mouse lines commonly used in transgenic studies. *Physiol Behav* 2001;**72**:271–81
- 62 Cook CJ, Mellor DJ, Harris PJ, Ingram JR, Matthews LR. Hands-on and hands-off measurement of stress. In: Morberg GP, Mench JA, eds. *The Biology of Animal Stress – Basic Principles and Implications for Animal Welfare*. UK: CAB International, 2000:123–46
- 63 Meijer MK, Kramer K, Remie R, Spruijt BM, Van Zutphen LFM, Baumans V. The effect of routine experimental procedures in mice kept under different husbandry conditions. *Anim Welf* 2006;**15**:31–38
- 64 Manser CE. *The Assessment of Stress in Laboratory Animals*. West Sussex: RSPCA, 1992